

# **Die Bedeutung des Peroxisomen-Proliferator- aktivierten Rezeptors gamma (PPAR $\gamma$ ) in humanen Meningeomen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Maria Heidrich**

**geboren am 25.06.1985 in Ilmenau**

### **Gutachter**

- 1. Prof. Dr. C. Mawrin, Magdeburg**
- 2. PD Dr. C. Ewald, Jena**
- 3. Prof. Dr. M. Riemenschneider, Regensburg**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2012**

Meinen Eltern gewidmet.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A. bidest.	Aqua bidest. (zweifach destilliert)
A. dest.	Aqua dest. (einfach destilliert)
Abb.	Abbildung
AMPK	AMP-aktivierte Proteinkinase
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	(engl.) <i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	(engl.) <i>B-cell lymphoma</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
ca.	circa
Casp3	Caspase-3
cDNA	(engl.) <i>complementary</i> DNA
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure
eIF4E-BP1	(engl.) <i>eukaryotic translation initiation factor 4E- binding protein1</i>
engl.	englisch
ERK1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FCS	fetales Rinderserum
FLIP	(engl.) <i>FADD-like IL1 converting enzyme inhibitory protein</i>
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPR	(engl.) <i>horseradish peroxidase</i>
IGF	(engl.) <i>Insulin-like growth factor</i>

I.U.	Internationale Einheit
IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MAPK	(engl.) <i>mitogen-activated protein (MAP) kinases</i>
MEK	MAPK/ERK Kinase
mg	Milligramm
min.	Minute
ml	Milliliter
mTOR	(engl.) <i>mammalian target of rapamycin</i>
µl	Mikroliter
mRNA	(engl.) <i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Natriumpyrophosphat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	(engl.) <i>Platelet-derived growth factor</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat
PGE2	Prostaglandin E2
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPAR	Peroxisom Proliferator-Aktivierter Rezeptor
PPRE	(engl.) <i>Peroxisome Proliferator Response Element</i>
PTEN	(engl.) <i>Phosphatase and Tensin homologue</i>
Raf	(engl.) <i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	(engl.) <i>Rat sarcoma</i>
Rheb	(engl.) <i>Ras homologue enriched in brain</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
sec	Sekunde
SDS	Natriumlaurylsulfat
siRNA	(engl.) <i>small interfering</i> RNA
SREBP	(engl.) <i>sterol regulatory element-binding protein</i>
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS	(engl.) <i>tris buffered saline</i> Tris-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	(engl.) <i>tumor necrosis factor</i>
tRNA	transfer-RNA
TSC	(engl.) <i>tuberous sclerosis complex</i>
TZD	Thiazolidindion (Glitazon)
u	(engl.) <i>Units</i>
U/min	Umdrehung pro Minute
V	Volt
WHO	(engl.) <i>World Health Organization</i>

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>11</b>
2.1 Meningeome.....	11
2.1.1 Epidemiologie und Klassifikation.....	11
2.1.2 Ätiologie und Zytogenetik.....	14
2.1.3 Lokalisation, klinische Symptomatik und bildgebende Diagnostik.....	15
2.1.4 Prognose und Therapiemöglichkeiten.....	17
2.2 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) .....	18
2.2.1 Allgemeines.....	18
2.2.2 PPAR $\gamma$ und dessen Funktion .....	19
2.2.3 PPAR $\gamma$ und Krebs .....	23
2.2.4 PPAR $\gamma$ in Hirntumoren .....	24
<b>3. Ziele der Arbeit .....</b>	<b>26</b>
<b>4. Methodik .....</b>	<b>27</b>
4.1. Material.....	27
4.1.1 Kultivierung von Zellen.....	27
4.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz .....	27
4.1.3 Proteinisolation aus Zellen und Gewebe .....	28
4.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	29
4.1.5 Western Blot.....	29
4.1.6 RNA Isolation .....	31
4.1.7 Bestimmung des RNA-Gehaltes .....	31
4.1.8 cDNA-Synthese.....	31
4.1.9 RT-PCR.....	31
4.1.10 Agarosegel-Elektrophorese.....	32
4.1.11 Proliferations-Assay .....	33
4.1.12 MTT-Assay .....	33
4.2 Methoden.....	33
4.2.1 Zellkulturen.....	33
4.2.1.1 Zellzahlbestimmung .....	34
4.2.2 Stimulation der Zellen.....	35
4.2.2.1 Insulin.....	35

4.2.2.2 PPAR $\gamma$ -Agonisten .....	35
4.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz .....	36
4.2.4 Proteinisolation.....	37
4.2.4.1 Proteinisolation aus Zellen .....	37
4.2.4.2 Proteinisolation aus Gewebe.....	37
4.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	38
4.2.5 Western Blot.....	38
4.2.6 RNA-Isolation .....	40
4.2.6.1 Bestimmung des RNA-Gehaltes .....	41
4.2.7 cDNA-Synthese.....	41
4.2.8 Polymerasekettenreaktion – RT-PCR .....	42
4.2.9 MTT-Assay .....	44
4.2.10 Proliferationsassay.....	45
4.2.11 Statistische Auswertung .....	46
<b>5. Ergebnisse</b> .....	47
5.1 PPAR- $\gamma$ Expression in humanen Meningeomen .....	47
5.2 PPAR- $\gamma$ Expression in humanen Meningeomzelllinien .....	48
5.3 Stimulation von PPAR $\gamma$ mit Rosiglitazon .....	51
5.4 Einfluss von Rosiglitazon auf die Meningeomzell-Proliferation.....	54
5.5 Stimulation von PPAR $\gamma$ mit Insulin.....	57
<b>6. Diskussion</b> .....	59
6.1 Diskussion der Ergebnisse .....	59
6.1.1 Expression von PPAR $\gamma$ .....	59
6.1.2 Die Rolle von IGF in humanen Meningeomen.....	60
6.1.2.1 PI3K/mTOR Signalweg .....	61
6.1.2.2 MAP-Kinase Signalweg.....	63
6.1.3 Interaktionen zwischen IGF und PPAR $\gamma$ .....	64
6.1.4 Möglichkeit PPAR $\gamma$ -unabhängiger Effekte.....	67
6.1.5 Kombinierte Therapieansätze .....	69
6.2 Diskussion der Methoden .....	70
6.2.1 Zellkultur.....	70
6.2.2 PCR.....	71
6.2.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen .....	72
6.2.4 Proliferations- und MTT-Assay .....	72



<b>7. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>74</b>
<b>8. Literatur- und Quellenverzeichnis .....</b>	<b>75</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>88</b>
<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>89</b>

## 1. Zusammenfassung

Meningeome gehören zu den häufigsten intrakraniellen Tumoren des zentralen Nervensystems. Etwa 80 % der Meningeome werden histologisch als gutartig eingestuft, ein Großteil davon ist chirurgisch vollständig resezierbar. Durch Weiterentwicklungen im neurochirurgischen Bereich wie dem „gamma knife“ oder der präoperativen Gefäßembolisation ergaben sich auch für Tumoren an schwierig zugänglichen Orten im Gehirn bessere Therapiemöglichkeiten. Eine suffiziente therapeutische Alternative für chirurgisch nicht resektable Meningeome existiert bisher jedoch nicht. Chemotherapeutika und Hormonrezeptorantagonisten konnten die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen und zeigten nur einen sehr geringen Einfluss auf das Wachstum von Meningeomen. In anderen Tumorzellen, wie beispielsweise den von Brust, Ovar, Kolon und Prostata ausgehenden, zeigten Glitazone, als direkte PPAR $\gamma$ -Agonisten, proapoptotische und anti-proliferative Wirkungen. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich diese Daten auch auf humane Meningeome übertragen lassen. Dafür wurden die Expression von PPAR $\gamma$  in verschiedenen humanen Meningeomgeweben und Tumorzelllinien mittels RT-PCR und Western Blot untersucht. Die Zelllinien IOMM-Lee und Ben-Men 1 wurden mit Insulin und Rosiglitazon stimuliert, um Veränderungen in der PPAR $\gamma$ -Expression bzw. in der Proliferation der Tumorzellen mit Hilfe von MTT- und Proliferations-Assay nachzuweisen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die quantitative Expression von PPAR $\gamma$  nicht mit dem Malignitätsgrad der Meningeome korreliert. Trotzdem ließ sich eine signifikante Reduktion der Proliferation und Viabilität sowohl in benignen als auch malignen Tumorzellen nach Stimulation mit PPAR $\gamma$ -Agonisten feststellen.

## 2. Einführung

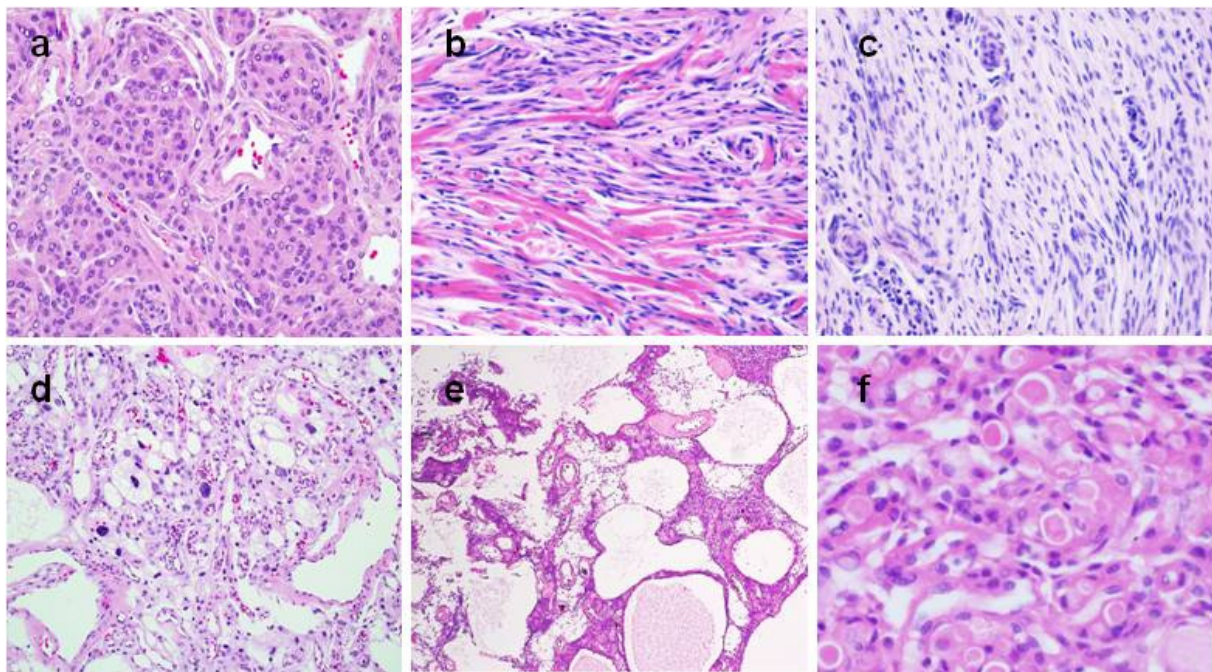
### 2.1 Meningeome

#### 2.1.1 Epidemiologie und Klassifikation

Meningeome sind meist langsam und verdrängend wachsende Tumoren der Meningen, die sehr wahrscheinlich von den arachnoidalen Deckzellen ausgehen. Sie stellen einen Anteil von etwa 15 bis 20 Prozent der primären intrakraniellen Tumoren dar (Mawrin und Perry 2010). Die jährliche Inzidenzrate wird mit etwa 3 bis 6 pro 100.000 angegeben, wobei die Inzidenz kontinuierlich mit zunehmendem Lebensalter steigt. Der Häufigkeitsgipfel liegt bei Frauen in der 7., bei Männern in der 6. Lebensdekade (DeMonte 1995). Im Gegensatz zu den Gliomen nimmt die Aggressivität der Meningeome im höheren Lebensalter jedoch ab. Die eher aggressiven oder malignen Verlaufsformen treten vorrangig bei jüngeren Patienten auf. Frauen sind 1,5 bis 3-mal häufiger betroffen als Männer. Besonders spinale Meningeome überwiegen deutlich beim weiblichen Geschlecht. Bei kindlichen Meningeomen, die allerdings nur etwa zwei Prozent der Gesamtanzahl ausmachen, zeigt sich eine Dominanz des männlichen Geschlechts. Da bei Männern häufiger anaplastische oder maligne Formen auftreten, ist die Prognose für sie insgesamt schlechter (Jaaskelainen et al. 1986).

Aufgrund der enormen Vielgestaltigkeit der Meningeome und ihrer Fähigkeit histologische Eigenschaften anderer Tumoren wie Astrozytome, Oligodendrogliome, Neuroblastome oder Karzinometastasen nachzuahmen, fiel ihre einheitliche Klassifikation und Erfassung sehr schwer. Von der Vielzahl der im Laufe der Zeit vorgenommenen Klassifikationsversuche seien nur der von Cushing in den 1920er Jahren und der von Russel und Rubinstein erstmals 1971 veröffentlichte genannt. Ersterer nahm fast ausschließlich auf die Tumorlokalisation Bezug, im Zweitgenannten hingegen wurden neben histologischen Kriterien bereits prognostische Aspekte mit berücksichtigt. Um weltweit einheitliche diagnostische Kriterien zu schaffen, wurde 1979 die erste Fassung der WHO-Klassifikation von Meningeomen propagiert, die seitdem mehrfach überarbeitet wurde. Laut der im Jahr 2007 veröffentlichten derzeit gültigen WHO-Klassifikation (Louis et al. 2007) werden Meningeome in 3 Grade und 16 Subtypen unterteilt (**Tabelle 1**), wobei in zwei unabhängigen Kohortenstudien (Ho et al. 2002) der prognostische Nutzen dieser

Einteilungskriterien belegt wurde. Dabei sind histologisches Grading und Ausmaß der chirurgischen Exzision von größter Bedeutung. Die langsam wachsenden und häufig chirurgisch komplett resezierbaren, benignen Meningeome stellen mit etwa 80 Prozent den weitaus größten Anteil dar. Sie entsprechen dem WHO-Grad I. Diese Gruppe wird weiter in 9 histologische Subtypen unterteilt, von denen die meningotheiomatöse, die fibroblastische und die transitionelle Variante die weitaus häufigsten sind (**Abbildung 1**). Die Mortalität ist im Vergleich zu Gesunden nach Komplettresektion nicht gesteigert. Allerdings werden trotz scheinbarer Komplettresektion Rezidivraten von bis zu 19 Prozent innerhalb von 20 Jahren berichtet (Jaaskelainen 1986). Außerdem zeigen einige histologisch benigne Meningeome invasives Wachstum, was eine Komplettresektion entsprechend schwerer oder unmöglich macht.



**Abbildung 1:** Histologische Subtypen von WHO-Grad I-Meningeomen.

**a:** Meningotheliomatöses Meningeom mit typischen „whorl“ Formationen, **b:** Fibroblastisches Meningeom mit vermehrter Kollagenfaserablagerung, **c:** Transitionales Meningeom mit fibrösen und meningeothelialen Tumoranteilen, **d:** Angiomatöses Meningeom mit Gefäßen verschiedenen Kalibers und degenerativen Zelltypen, **e:** Mikrozystisches Meningeom mit typischen Mikrozysten, **f:** Sekretorisches Meningeom mit Pseudopsammomkörperchen (aus Mawrin und Perry 2010).

**Tabelle 1:** Aktuelle WHO-Einteilung von Meningeomen

Histologischer Subtyp	WHO Grad
Meningotheliomatöses Meningeom	I
Fibroblastisches (fibröses) Meningeom	I
Transitionales (gemischtes) Meningeom	I
Psammomatöses Meningeom	I
Angiomatöses Meningeom	I
Mikrozystisches Meningeom	I
Sekretorisches Meningeom	I
Lymphoplasmozytenreiches Meningeom	I
Metaplastisches Meningeom	I
Chordoides Meningeom	II
Klarzell-Meningeom (intrakraniell)	II
Atypisches Meningeom	II
Hirn-invasives Meningeom	II
Papilläres Meningeom	III
Rhabdoides Meningeom	III
Anaplastisches (malignes) Meningeom	III

nach Mawrin und Perry 2010

Die dem WHO-Grad II entsprechenden atypischen Meningeome sind für etwa 15 bis 20 Prozent der Fälle verantwortlich (Buccoliero et al. 2003, Willis et al. 2005). Varianten sind das Klarzell-, das chordoide und das atypische Meningeom. Sie sind mit einer deutlich gesteigerten Rezidivrate und statistisch signifikant gesteigerter Mortalität verbunden. Selbst bei Komplettresektion liegt die 5-Jahres-Rezidivrate bei 40 Prozent (Perry et al. 1997). Diagnostische Kriterien sind erhöhte mitotische Aktivität, Hirngewebsinvasion, deutlich verschobene Kern-Plasma-Relation, Hyperzellularität, Spontannekrosen, u.a.. Als WHO-Grad III werden anaplastische oder maligne Meningeome bezeichnet. Sie stellen zwar lediglich 2 Prozent der Fälle dar (Jaaskelainen et al. 1985, Perry A. 1999, Mawrin und Perry 2010), gehen allerdings mit einer mittleren Überlebenszeit von nur 2 Jahren einher. Typischerweise zeigen sie entweder exzessiv erhöhte mitotische Aktivität oder eine deutlich

anaplastische Histologie, die als Sarkom-, Karzinom- oder Melanomartige Morphologie bezeichnet werden kann. Dem Grad III werden papilläre, rhabdoide und anaplastische Meningeome zugerechnet. Zu den gefürchteten, wenn auch seltenen Komplikationen vor allem der malignen Varianten zählen Fernmetastasen, die gleichzeitig als klinisches Malignitätskriterium gelten.

### 2.1.2 Ätiologie und Zytogenetik

Die Ätiologie sporadischer Meningeome ist nicht vollständig geklärt. Als gesichert kann allerdings der Zusammenhang mit einer Strahlenexposition angenommen werden. Sowohl therapeutische Bestrahlung bei Tinea capitis oder primären Hirntumoren (Sadetzki et al. 2002), als auch akzidentelle Bestrahlung bei Atombombenexplosionen (Shintani et al. 1999) kommen hierbei in Frage. Als in besonderem Maße gefährlich ist die Schädelbestrahlung im Kindesalter belegt. Die Rolle von Sexualhormonen in der Meningeomgenese konnte bisher hingegen nicht zweifelsfrei geklärt werden (Schrell und Fahlbusch 1991, Perry et al. 2000). Zwar besitzen etwa 90 Prozent aller Meningeome Progesteronrezeptoren (Pravdenkova et al. 2006) und ein Großteil Androgen-, Somatostatin-, Wachstumshormon- und Prolactinrezeptoren, die biologische Signifikanz dieser Rezeptoren und entsprechende Funktionalität werden jedoch immer noch kontrovers diskutiert (Dutour et al. 1998, Friend et al. 1999, Konstantinidou et al. 2003). Der vielfach postulierte Zusammenhang von Meningeomen mit Schädel-Hirn-Traumata wurde von einer Vielzahl von Studien widerlegt oder zumindest als minimal beschrieben (Annegers et al. 1979, Inskip et al. 1998). Patienten mit einem autosomal-dominant erblichen Tumorleiden wie der Neurofibromatose 2, welche Veränderungen am Genlokus 22q12.2 zeigen, besitzen eine Prädisposition für multiple Meningeome (Dumanski et al. 1990, Evans et al. 1992, von Deimling et al. 1995). Auch bei einigen sporadisch auftretenden Meningeomen, vor allem der fibrösen Variante, konnten genetische Veränderungen (Allelverlust, Mutationen usw.) im NF2-Gen nachgewiesen werden. Der Funktionsverlust des NF2-codierten Proteins Merlin scheint bei bis zu 50 Prozent aller Meningeome eine kritische Rolle zu spielen (Ruttledge et al. 1994). Weiterhin wird angenommen, dass Deletionen am kurzen Arm von Chromosom 1, 9 und 10 sowie am langen Arm von Chromosom 6 und 14 (Simon et al. 1995, Al-Mefti et al. 2004), ebenso wie Amplifikationen am langen Arm

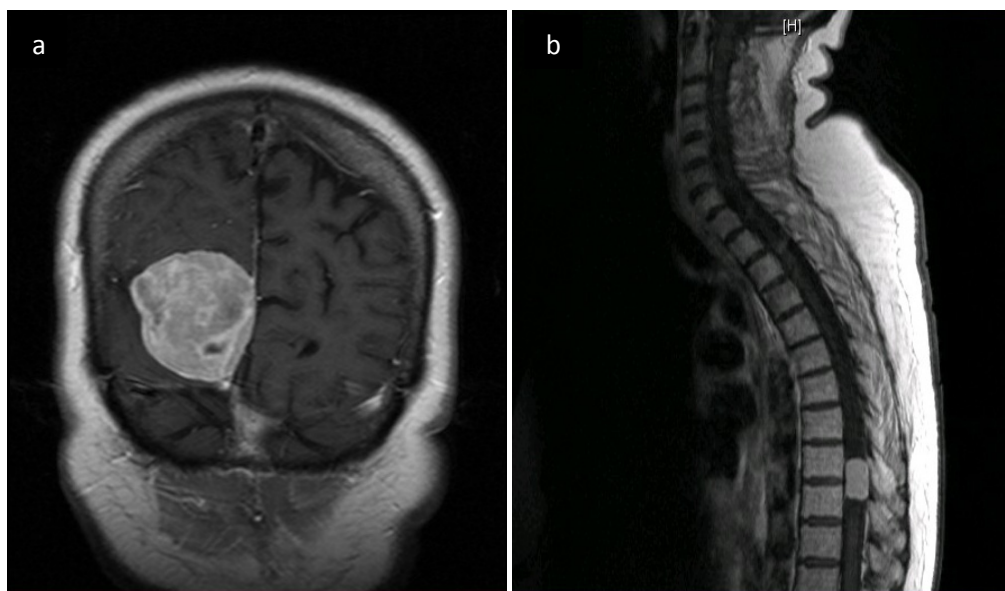
von Chromosom 17 und 20 (Weber et al. 1997) von Bedeutung für die Meningeomgenese sind. Auch die Deletion und der Verlust der Proteinexpression von Vertretern der homologen Protein 4.1-Familie scheinen von Bedeutung zu sein (Gutmann et al. 2000). Ferner konnten eine ganze Reihe an Faktoren identifiziert werden, die mit maligner Entartung von Meningeomen in Verbindung stehen. Zu diesen zählen unter anderem erhöhte Telomerasenaktivität, gesteigerte Tenascin- und VEGF-Spiegel (*Vascular endothelial growth factor*) (Provias et al. 1997, Sanson und Cornu 2000) sowie der Expressionsverlust eines auf Chromosom 14 lokalisierten Tumorsuppressorgens, NDRG2 (Lusis et al. 2005). VEGF scheint außerdem für die Ausbildung des peritumoralen Ödems und für die Mobilisation von Tumorzellen, welche mit der Entstehung von Sekundärtumoren in Verbindung stehen, verantwortlich zu sein (Kalkanis et al. 1996). Weiterhin wurden diverse Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren vermehrt in Meningeomen gefunden, unter anderem PDGF (*platelet derived growth factor*) (Todo et al. 1996, Mawrin et al. 2005), IGF (*insulin like growth factor*) (Lichter et al. 1993), EGF (*epidermal growth factor*) und TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor*) (Nordqvist et al. 1997, Cui et al. 2002).

### 2.1.3 Lokalisation, klinische Symptomatik und bildgebende Diagnostik

Die überwiegende Mehrzahl an Meningeomen tritt intrakraniell, intraspinal oder intraorbital auf. Etwa die Hälfte der intrakraniellen Meningeome findet sich über der Konvexität, oftmals parasagittal mit Assoziation zur Falx cerebri und dem Sinus venosus. In der Schädelbasisregion treten weitere 30 Prozent auf (Kallio et al. 1992). Unabhängig vom Malignitätsgrad finden sich vor allem bei diesen hyperostotische Veränderungen und Knocheninfiltration (Pieper et al. 1999). Ebenso zeigen selbst benigne Meningeome oftmals Infiltrationen in Kopfhaut, Gehirn und andere angrenzende Weichteilstrukturen. Spinale Meningeome kommen meist in der Thoraxregion vor. Seltene Varianten wurden in fast allen Organen gefunden. Metastasen von malignen Meningeomen finden sich bevorzugt in Lunge, Pleura, Knochen und Leber (Kepes 1982).

Je nach Lokalisation, Wachstumsgeschwindigkeit, Invasion oder Kompression umliegender Strukturen treten Meningeome klinisch verschieden in Erscheinung.

Häufig sind Kopfschmerzen, Krampfanfälle, Sehfeld- und Hirnnervenausfälle, motorische und sensorische Defizite sowie kognitive und Wesensveränderungen (Sutherland et al. 1987). Die mit Abstand meisten Meningeome bleiben jedoch asymptomatisch und werden zufällig im Rahmen von Autopsien oder radiologischen Schädeluntersuchungen mit unabhängigen Fragestellungen gefunden. Im cCT sind Meningeome oft primär isodens, häufig verkalkt, nur sehr selten zystisch verändert und nach Kontrastmittelgabe stark anreichernd. Im T2-gewichteten MRT lassen sich Meningeome als hypo- bis hyperdense, kontrastmittelaufnehmende Läsionen darstellen. Charakteristisches Zeichen im MRT ist des Weiteren eine gut sichtbare, oft über den eigentlichen Ansatz hinausgehende Signalanhebung in den Meningen. Sie wird als „*meningeal tail sign*“ bezeichnet (**Abbildung 2**). Eher maligne Varianten der Meningeome stellen sich sowohl in T<sub>1</sub>- als auch in T<sub>2</sub>-gewichteten MRT-Aufnahmen häufig als hyperdense Läsionen mit irregulärem Tumorrand, zentralen Nekrosen, extensivem peritumoralem Ödem und fehlender Verkalkung dar (Engelhard 2001). Allerdings ermöglichen diese Zeichen keine sichere Diagnose oder Abschätzung der Prognose. Weitere Methoden wie diffusionsgewichtete MRT-Darstellungen und PET-Verfahren mit Somatostatinrezeptoren können zusätzlich aufschlussreiche Aussagen liefern (Henze et al. 2001).



**Abbildung 2:** MRT-Charakteristika von Meningeomen

- a:** T1-gewichtetes MRT- Bild mit parasagittalem Meningeom und deutlichem „*meningeal tail sign*“  
**b:** Thorakales Meningeom (Mit freundlicher Genehmigung Prof. Mayer Universitätsklinikum Jena).



#### 2.1.4 Prognose und Therapiemöglichkeiten

Die Prognose der betroffenen Patienten hängt entscheidend vom WHO-Grad, der Lokalisation und dem Infiltrations- und Resektionsgrad (Simpson 1957) des Tumors ab. Es scheint jedoch noch weitere Indikatoren für eine schlechte Prognose zu geben (**Tabelle 2**). Generell kann man bei benignen Meningeomen von einer Rezidivwahrscheinlichkeit von etwa 7 Prozent ausgehen. Atypische Meningeome rezidivieren in 29-40 Prozent und anaplastische in 50-78 Prozent der Fälle (Maier et al. 1992, Perry et al. 1999, Jaaskelainen et al. 1985). Gelingt die chirurgische Resektion nicht vollständig, steigt die Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs deutlich an. Nach erfolgter Therapie liegt die mediane Überlebenszeit eines Patienten mit atypischem Meningeom bei 142,5 Monaten, das mediane rezidivfreie Intervall bei 39,8 Monaten. Bei Patienten mit anaplastischem Meningeom liegen diese Werte bei 138,5 bzw. 32,2 Monaten (Yang et al. 2008).

**Tabelle 2:** Indikatoren für eine schlechte Prognose bei Meningeomen

---

- Atypische (WHO Grad II) oder anaplastische (WHO Grad III) Meningeome
  - Aggressive histologische Varianten (Klarzell, Chordoides, Papilläres oder Rhabdoides Meningeom)
  - Subtotale Resektion
  - Patientenalter < 40 Jahre
  - Hoher Proliferationsindex
  - Beteiligung der anterioren Sehnervenbahn
  - Infiltration von Blutgefäßen
- 

Modifiziert nach McLendon et al. 2006

Die Therapieindikation ergibt sich aus der Raumforderung, der Symptomatik, der Erkrankungsdynamik, dem Lebensalter sowie dem Allgemeinzustand des Patienten. Als Therapieverfahren erster Wahl gilt bei symptomatischen Meningeomen immer noch die chirurgische Exzision. Zwar sind dank verschiedener Fortschritte in der Mikrochirurgie mittlerweile selbst Meningeome in schwierig zugänglichen Regionen zumindest teilweise resezierbar geworden, jedoch ist die Mortalität auch bei benignen Meningeomen deutlich erhöht, wenn Hirnnerven ummauert oder große venöse Blutleiter infiltriert sind (Natarajan et al. 2007). Zusätzlich zu chirurgischen

Verfahren oder als Alternative bei chirurgisch nicht-resektablen Meningeomen werden nichtinvasive Techniken wie die präoperative Embolisation des tumorversorgenden Gefäßes (Nelson et al. 1994) und das sogenannte „*gamma knife*“, ein stereotaktisch radiochirurgisches Verfahren, angewendet.

Postoperative Bestrahlung wird heute bei subtotal resezierten atypischen und allen malignen Meningeomen eingesetzt, wobei der Nutzen hierbei nicht unumstritten ist (Goldsmith et al. 1994, Condra et al. 1997). Eine medikamentöse Standardtherapie für nicht resezierbare Meningeome existiert bisher noch nicht. Die chemotherapeutischen Ansätze mit Hydroxyurea (Mason et al. 2002, Fuentes et al. 2004, Newton et al. 2004), Progesteronrezeptorantagonisten (Modha und Gutin 2005, Grunberg et al. 2006) und EGF-Rezeptorantagonisten wie Gefitinib (Johnson et al. 2008) enttäuschten die in sie gesetzten Erwartungen. Einen neuartigen Therapieansatz könnte die Stimulation des PPAR $\gamma$ -Rezeptors darstellen.

## 2.2 Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs)

### 2.2.1 Allgemeines

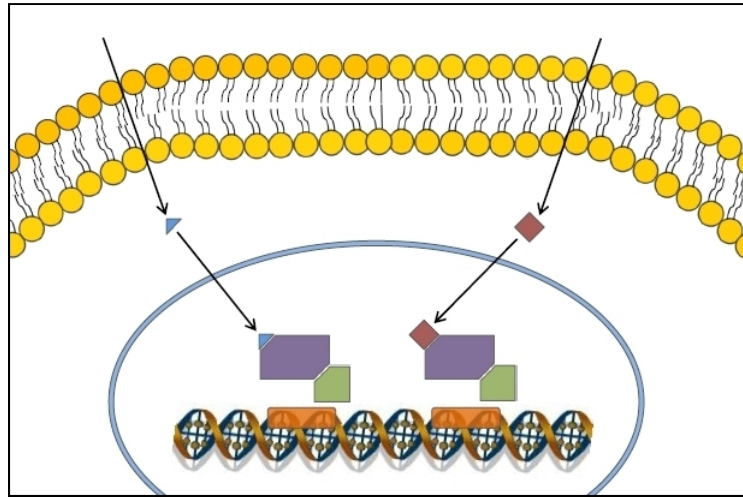
Peroxisomen-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPARs) gehören zu einer Superfamilie von nukleären Rezeptoren, welche es der Zelle ermöglichen auf extrazelluläre Stimuli mittels Regulation der Genexpression zu reagieren. Sie stellen Transkriptionsfaktoren dar, zu deren normalen Liganden Fettsäuren oder Fettsäurederivate zählen. Ebenso ist es ihnen möglich, synthetische Agonisten zu binden. Unter Laborbedingungen können sie durch genetische Manipulation aktiviert werden. Wenn PPARs ihren Liganden gebunden haben, können sie Heterodimere mit dem Kernrezeptor RXR (*Retinoid-X-Rezeptor*) bilden (Lehmann et al. 1995, Kliewer et al. 1992). Das entstandene Dimer bindet dann an bestimmte Regionen der DNA, welche als PPRE (*PPAR-Response-Elemente*) bezeichnet werden. Durch die Bindung an Promotorregionen bestimmter Zielgene wird die Transkription dieser angeregt. Es werden drei Subtypen von PPARs unterschieden, die sich durch charakteristische Expressionsmuster, Spezifität in der Ligandenbindung und unterschiedliche biologische Funktionen auszeichnen. Sie werden als PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  und PPAR $\gamma$  bezeichnet. PPAR $\alpha$  wurde 1990 als erster Rezeptor dieser Gruppe beschrieben und erhielt seinen Namen aufgrund der Fähigkeit, die

Proliferation von Peroxisomen zu induzieren (Issemann und Green 1990, Lee et al. 1995). Exprimiert wird PPAR $\alpha$  vorrangig in Skelettmuskeln, Leber, Niere und Endothelzellen, wo es eine entscheidende Rolle im Fettsäurestoffwechsel sowie der Kontrolle von Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielt. Als direkte Agonisten von PPAR $\alpha$  wirken Fibrate, welche aufgrund dessen seit einigen Jahrzehnten zur Behandlung der Dyslipidämie eingesetzt werden. PPAR $\beta/\delta$  kommt in fast allen Körpergeweben vor, höhere Spiegel finden sich jedoch besonders im Gehirn, im Fettgewebe und in der Haut. Dieser Rezeptor ist unter anderem an der Differenzierung von Oligodendrocyten und an der Thermogenese beteiligt. PPAR $\gamma$  wird ebenfalls in fast allen Geweben exprimiert, verstärkt jedoch in Fettgewebe. Er ist der am intensivsten untersuchte Rezeptor dieser Gruppe und wird in den folgenden Kapiteln detailliert vorgestellt.

### 2.2.2 PPAR $\gamma$ und dessen Funktion

Der Aufbau des PPAR $\gamma$  Proteins entspricht dem eines typischen Kernrezeptors. Dabei ist die C-terminale Region des PPAR $\gamma$  Proteins für die Dimerisation mit RXR verantwortlich. Sie enthält die AF2 Domäne, welche für die Transkriptionsaktivierung entscheidend ist. Diese amphipathische Helix entspricht der Liganden-Bindungstasche und ist weiterhin für die ligandenabhängige Bindung coaktivierender Proteine von großer Wichtigkeit. Zu diesen zählen PGC-1 $\alpha$ , CBP/p300, die SRC-Familie und TRAP220 (Powell et al. 2007). SMART, NCoR und RIP140 hingegen sind als Corepressoren in der Lage die Aktivität von PPAR $\gamma$  zu supprimieren (Debevec et al. 2007). Die 120 Aminosäuren der N-terminalen Region von PPAR $\gamma$  besitzen transkriptionelle Aktivität, wenn sie an eine heterologe DNA-Bindungsdomäne gebunden sind. Allerdings scheint der N-Terminus zusätzlich auch inhibitorische Funktion auszuüben, da bei Deletion des N-Terminus die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors zunimmt (Tontonoz et al. 1994). Hier ließ sich ein Zusammenhang zur Phosphorylierung von PPAR $\gamma$  herstellen, welche durch Erk 1 und Erk 2, Vertreter der Familie der MAP-Kinasen, vermittelt wird. So wird die biologische Aktivität des Rezeptors durch Phosphorylierung am N-Terminus deutlich reduziert (Hu et al. 1996). Wie die vielfältigen Funktionen des N-Terminus letztlich auf mechanistischer Ebene umgesetzt werden bleibt jedoch Gegenstand weiterführender Forschung.

Zu den natürlich vorkommenden Liganden des PPAR $\gamma$ -Rezeptors gehören mehrfach ungesättigte Fettsäuren, spezielle Prostanoiden, oxidierte Fettsäuren wie 9-HODE und 13-HODE und nitrierte Fettsäuren (Forman et al. 1995, Kliewer et al. 1997, Schopfer et al. 2005). Glitazone hingegen stellen eine Gruppe von synthetischen PPAR $\gamma$ -Agonisten dar (**Abbildung 3**). Noch bevor ihr eigentlicher Wirkmechanismus im Detail bekannt wurde, fanden sie bereits in der medikamentösen Therapie des Diabetes mellitus Typ II Anwendung, da sie den Blutglukosespiegel senken (Nolan et al. 1994). Sie werden heute den Insulin-Sensitizern zugeordnet. Ein Vertreter dieser Gruppe der Glitazone ist Rosiglitazon. Sobald dieses an ein PPAR $\gamma$ -Protein bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung, welche unter anderem die AF2-Aktivierungsdomäne beeinflusst und zu einer direkten Interaktion dieser mit einer Coaktivierungsdomäne führt. Rosiglitazon ist chiral und existiert in Form zweier Enantiomere, die als 1:1 Gemisch (Racemat) in den Handelspräparaten zum Einsatz kommen. Da die Bioverfügbarkeit nach oraler Aufnahme 99 Prozent beträgt, kann die Verabreichung unkompliziert als Tablette erfolgen. Der Abbau erfolgt über das Cytochrom P450 System der Leber. Die Ausscheidung geschieht zu 70 Prozent über die Niere, zu 30 Prozent über den Darm. Zu den häufigsten bekannten Nebenwirkungen zählen Ödeme, Anämie, Gewichtszunahme und Hypercholesterinämie. Weiterhin wird ein möglicherweise erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen sehr kontrovers diskutiert, wobei in einer Metaanalyse ein deutlich gesteigertes Risiko postuliert wird (Nissen und Wolski 2007), welches in anderen Studien jedoch widerlegt wurde (Home et al. 2007). Die endgültigen Ergebnisse weiterer Langzeitstudien werden entscheidend darauf Einfluss nehmen, bei welchen Indikationen und in welcher Dosierung Rosiglitazon weiterhin verordnet werden wird. Die Tatsache, dass bereits vielfältige klinische Studien zur Verträglichkeit dieses Wirkstoffes vorliegen und dieser entsprechend etabliert ist, stellt jedoch einen Vorteil für einen möglichen Einsatz als Chemotherapeutikum bei Tumorerkrankungen dar. Interessant ist dabei in Anbetracht der bekannten tumorbeeinflussenden Wirkung (siehe unten) auch die Beobachtung jener Patienten, die bereits Rosiglitazon einnehmen, in Hinblick auf Häufigkeit und Art von Tumoren.



**Abbildung 3:** Aktivierungsschema für PPAR $\gamma$

■ = RXR, ■ = PPAR $\gamma$ , ■ = Promotor, ◆ = Glitazon, ▲ = ungesättigte Fettsäure, — = Kernmembran

Mehrfach ungesättigte Fettsäuren als natürliche Liganden oder Glitazone als synthetische Agonisten binden an den PPAR $\gamma$ -Rezeptor, der daraufhin ein Heterodimer mit dem Kernrezeptor RXR (Retinoid-X-Rezeptor) bilden kann. Dieses Dimer bindet an sogenannte PPRES (PPAR-Response-Elemente) in Promotorregionen bestimmter Zielgene, wodurch deren Transkription angeregt wird (selbst entworfenes Schema).

Mittlerweile steht fest, dass PPAR $\gamma$  der entscheidende Regulator der Adipogenese ist. Es wird sowohl in weißen als auch in braunem Fettgewebe in hohen Spiegeln exprimiert und ist während der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten induziert. In Abwesenheit von PPAR $\gamma$  scheinen Fettzellen nicht entstehen zu können (Sears et al. 1996, Rosen et al. 1999). Die entsprechende Transkriptionskaskade beinhaltet Mitglieder der CAAT/EBP (*enhancer binding protein*)-Familie. Sobald C/EBP- $\beta$  und - $\delta$  hormonell induziert werden, binden sie direkt an den PPAR $\gamma$ -Promotor und induzieren PPAR $\gamma$  (Wu et al. 1996). Dieses wiederum kann nach Ligandenaktivierung vielfältige, in der Lipo- und Adipogenese sowie für die Insulinsensitivität wichtige Zielgene anschalten. Zu diesen gehören unter anderem aP2, PEPCK, LPL, Adiponectin und Glut4. Typischerweise finden sich diese PPRES (*PPAR-Response-Elemente*) nicht in proximalen Promotorregionen, sondern eher in vorgeschalteten Enhancer-Regionen (Tontonoz et al. 1995).

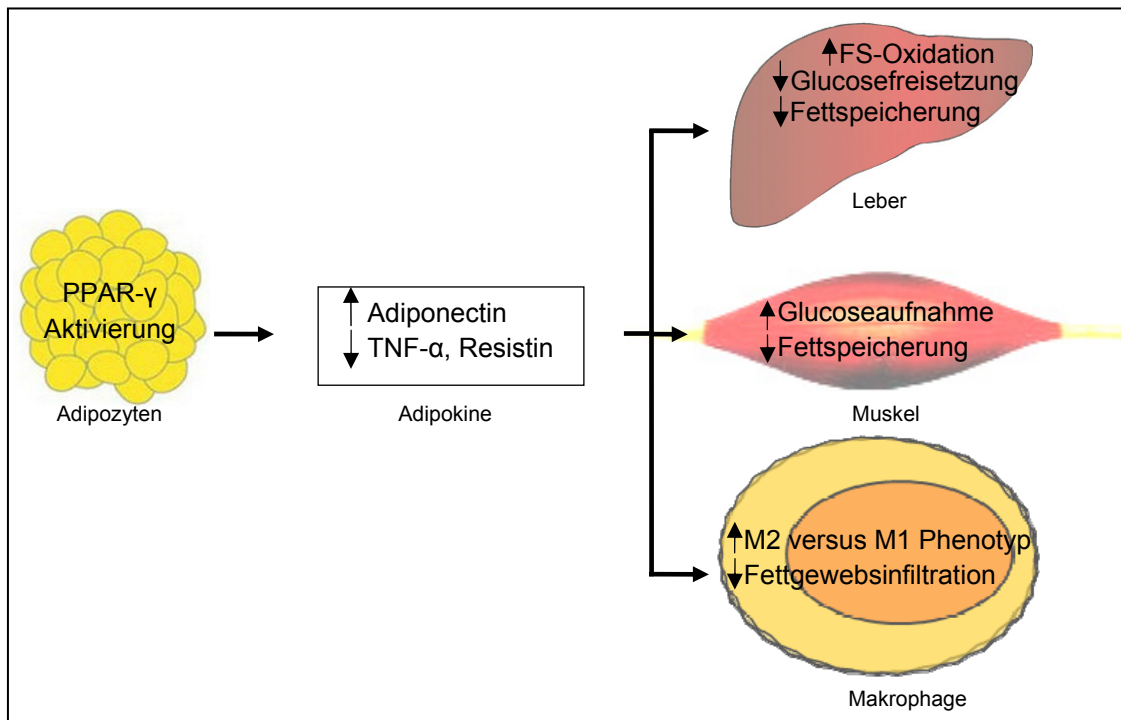
Eine gesteigerte Expression von PPAR $\gamma$ -Zielgenen in weißem Fettgewebe erhöht die Speicherkapazität von mit der Nahrung aufgenommenen Fettsäuren, wodurch die Plasmaspiegel an freien Fettsäuren deutlich gesenkt werden (Boden et al. 2005). Indem diese Fettsäuren nicht mehr fälschlicherweise in Leber und Muskel abgelagert

werden, verbessert sich außerdem die Insulinsensitivität (Sinha et al. 2002). Ferner führt die Aktivierung von PPAR $\gamma$  nicht nur zur Zunahme der Fettgewebssmasse, sondern auch zur Bildung kleinerer, insulinsensitiverer Fettzellen (Okuno et al. 1998). Dies wird unter anderem über eine direkte Regulation des Adiponectin-Gens erreicht (Berg et al. 2002, Yu et al. 2002). Verschiedene Forschungsgruppen konnten zeigen, dass all diese Effekte durch die Gabe von Glitazonen als direkte Agonisten von PPAR $\gamma$  erzielt werden konnten (**Abbildung 4**) (Inzucchi et al. 1998, Trujillo und Scherer 2006). Ein Zusammenhang konnte weiterhin zwischen PPAR $\gamma$ -Aktivierung und einer verminderten Produktion von TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor*) und Resistin bewiesen werden. Es wird angenommen, dass diese Proteine zur Entwicklung von Insulinresistenz beitragen (Steppan et al. 2001). Auch wird eine Verbindung zwischen gesteigerter PPAR $\gamma$ -Aktivität in Makrophagen und erhöhter Insulinsensitivität postuliert. Durch die Einwanderung von Makrophagen in Fettgewebe kommt es ursprünglich zur vermehrten Produktion von Entzündungsmediatoren wie IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und IL-6, welche mitverantwortlich für die Entwicklung von Insulinresistenz sind (Wellen und Hotamisligil 2005). Mittels Aktivitätssteigerung von PPAR $\gamma$  durch Glitazone kann die Insulinresistenz vermindert und die Insulinsensitivität deutlich gesteigert werden.

In Makrophagen und Dendritischen Zellen können PPAR $\gamma$ -Agonisten jedoch auch direkten Einfluss auf Immun- und Entzündungsprozesse nehmen. Sie induzieren dabei die Differenzierung zu alternativ aktivierten M2-Makrophagen, welche antiinflammatorisch wirken (Odegaard et al. 2007). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  zum einen zur mit anderen Kernrezeptoren überlappenden Inhibition von Entzündungsgenen befähigt ist, andererseits aber auch einzigartige Funktionen in der Immunmodulation besitzt (Ogawa et al. 2005). Eindrückliches Beispiel dieser entzündungshemmenden Funktionen ist die Verhinderung von chemisch-induzierter Kolitis durch PPAR $\gamma$ -Agonisten (Rousseaux et al. 2005).

Die direkte Beeinflussung von Makrophagen durch Glitazone geht zusätzlich mit einer Reduktion arteriosklerotischer Läsionen einher (Bouhrel et al. 2007 ). Ferner wurde über eine verminderte Bildung läsionstypischer Schaumzellen berichtet (Li et al. 2004). Allerdings konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob sich durch eine Behandlung mit Glitazonen tatsächlich eine protektive Wirkung hinsichtlich kardiovaskulärer Erkrankungen erzielen lässt, da dies zwar von einigen Studien

belegt werden konnte (Haffner et al. 2002), andere jedoch sogar von einem gesteigerten Risiko ausgehen (Nissen und Wolski 2007).



**Abbildung 4:** Übersicht über verschiedene, gewebespezifische Regulationsmechanismen, die durch PPAR-γ-Aktivierung induziert werden. Modifiziert nach Tontonoz und Spiegelman 2008.

### 2.2.3 PPARγ und Krebs

Obwohl die Konzentrationen von PPARγ in Fettzellen am höchsten sind, exprimieren auch andere Körperzellen diesen Rezeptor. Vertreter sind beispielsweise Kolonepithelien und Epithelzellen aus Brust und Prostata. Daher kann davon ausgegangen werden, dass nicht nur Fettgewebe und Tumoren, die von diesem ausgehen, durch Glitazone zu beeinflussen sind. In verschiedenen Studien konnte nachgewiesen werden, dass Glitazone deutliche Effekte auf Zellwachstum und Differenzierung beim humanen Liposarkom ausüben. Diese beinhalten charakteristische morphologische Veränderungen, Fettanreicherung und Stillstand des Zellwachstums (Tontonoz et al. 1997). Ähnliche Daten gibt es zu einer Vielzahl anderer Tumorzellen. Alle zeigen als Antwort auf die Behandlung mit Glitazonen ein sistierendes Wachstum und eine Tendenz zur verstärkten Differenzierung. Zu den Ursprungsorganen besagter Tumorzellen gehören Lunge, Ovarien, Brust, Schilddrüse, Kolon und Prostata (Han S 2007). Wie groß der Anteil an den

genannten Effekten der Glitazone ist, der tatsächlich durch PPAR $\gamma$ -Rezeptoren vermittelt wird, ist noch unbekannt. Sicher scheint jedoch, dass PPAR $\gamma$  das Potential hat, die Wachstumsrate vieler Tumorzellen zu beeinflussen. Es existieren verschiedene Theorien, wie genau die Aktivierung von PPAR $\gamma$  das Zellwachstum beeinflusst. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$ -Aktivierung mittels Modulation von Phosphatasenaktivität eine Reduktion der E2F DNA-Bindungsaktivität verursachen kann (Altioek et al. 1997). Weiterhin wurde durch PPAR $\gamma$ -Aktivierung eine Reduktion des  $\beta$ -Catenin-Spiegels nachgewiesen, dessen Rolle in der Karzinomgenese von Kolontumoren gut belegt ist (Moldes et al. 2003). PPAR $\gamma$  fungiert als Tumorsuppressorgen im genetischen Sinn, wobei diese Funktion eine Abhängigkeit vom APC-Gen zeigt. Die in einer gewissen Anzahl von Kolontumoren gefundenen Mutationen im PPAR $\gamma$ -Gen unterstützen die Annahme, dass das PPAR-Gen und eventuelle Mutationen darin eine entscheidende Rolle bei der Entstehung humaner Tumorerkrankungen spielen (Sarraf et al. 1999).

Obwohl viele Tumorzellen vielversprechend auf Stimulation durch Glitazone reagieren, konnte in mehreren kleinen klinischen Studien kein Erfolg einer Monotherapie mit diesen Medikamenten nachgewiesen werden (Burstein et al. 2003, Smith et al. 2004). Allerdings wurden in Kombination mit Platin-Chemotherapeutika deutliche synergistische Effekte erzielt, die wahrscheinlich auf einer Unterdrückung von Metallothioneinen beruhen (Girnun et al. 2007). Auch eine Kombination mit Paclitaxel aus der Gruppe der Taxane zeigte positive Resultate (Lichter et al. 2008).

#### 2.2.4 PPAR $\gamma$ in Hirntumoren

In verschiedenen jüngst veröffentlichten Studien konnte unabhängig gezeigt werden, dass Glitazone in Gliomzellen Apoptose induzieren und Proliferationsraten reduzieren. Bemerkenswert ist dabei, dass bei identischer Dosierung keinerlei zytotoxische Effekte in primären Astrozyten beobachtet wurden (Zander et al. 2002). Die unterschiedlichen Forschergruppen untersuchten dabei verschiedene Ansätze, wie die genannten Effekte vermittelt werden könnten. Unter anderem wird ein Einfluss von PPAR $\gamma$ -Aktivierung auf die metabolischen Eigenschaften von Gliomen postuliert (Spagnolo et al. 2007). Dabei sollen Unterschiede im Membranpotential von Mitochondrien sowie im Glukose- und Lactatspiegel nicht durch eine PPAR $\gamma$ -abhängige Aktivierung der Genexpression vermittelt werden. Vielmehr spiele eine



neuentdeckte Bindungsstelle für Glitazone auf Mitochondrien, die als MitoNEET bezeichnet wird, eine entscheidende Rolle. Die durch MitoNEET vermittelten metabolischen Effekte sollen die unterschiedliche Empfindlichkeit von primären Astrozyten versus neoplastischen Zellen erklären. Unabhängig davon konnte eine, vor allem im Tumorrand, extrem reduzierte Expression von MMP-9 (*Matrix Metalloproteinase*) gezeigt werden (Grommes et al. 2006). Dieses ist bedeutsam für die Invasivität und Malignität von Gliomen. Eine durch Glitazone induzierte Expressionsreduktion von MMP-9 führt somit zu vermindertem invasivem Wachstum. Weiterhin wurde eine deutlich erhöhte CS-56-Expression im Tumorrand nachgewiesen. CS-56 gilt als Marker für Redifferenzierung in maligne entarteten Astrozyten. Demzufolge scheint die PPAR $\gamma$ -abhängige Wirkung von Glitazonen nicht nur auf die Induktion von Zelltod und die verminderte Proliferation von neoplastischen Zellen beschränkt. Auch konnte eine durch Glitazone vermittelte transkriptionelle Repression von TGF- $\beta$  (*Transforming growth factor*) gezeigt werden (Coras et al. 2007). Durch diesen Effekt konnten Migration und Invasion von Gliomzellen in umliegendes Hirngewebe deutlich verringert werden. Ferner wurde eine durch Glitazone induzierte Steigerung der Expression von p53 und dessen Effektor p21<sup>WAF1/CIP1</sup> sowie gesteigerte Spaltung der Caspase 9 und verstärkte DNA-Fragmentierung beschrieben (Bonofiglio et al. 2006). Die Relevanz aller dieser Mechanismen im Rahmen der Apoptose ist bereits gut belegt. Als weitere Möglichkeiten antineoplastische Effekte zu vermitteln, wurden unter anderem die Hochregulation von CDK (*Cyclin dependent Kinase*)-Inhibitoren und die verminderte Expression von Cyclin D1 postuliert, die mit einer Beeinflussung des Zellzyklus einhergehen (Lichtor et al. 2008). Detaillierte Untersuchungen zur Bedeutung des PPAR $\gamma$ -Rezeptors in humanen Meningeomen existieren bislang jedoch nicht.

### 3. Ziele der Arbeit

Ein Großteil aller Meningeome ist benigne bzw. mit etablierten neurochirurgischen Methoden zu behandeln. In einigen Fällen ist heute jedoch ein Eingriff z.B. auf Grund der nicht resektablen Lage des Tumors oder der Infiltration venöser Gefäße durch den Tumor zu riskant oder unmöglich. Somit verbleibt eine Patientengruppe, die z.Z. nicht oder nicht vollständig therapierbar ist und deutlich erhöhte Rezidivraten zeigt. Da Meningeome zudem nur mit geringem Erfolg durch konventionelle Chemotherapeutika und Hormonrezeptorantagonisten zu kontrollieren sind, ist die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten wichtig. Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und biologische Bedeutung von PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen besser zu charakterisieren.

Hierzu wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Nachweis von PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen und Meningeomzellen mit Hilfe von Immunfluoreszenz, Western Blot und RT-PCR
- PPAR $\gamma$ -Expression nach Insulin-Stimulation von Meningeomzellen
- Auswirkungen einer Rosiglitazon-Behandlung auf das Zellüberleben und die Proliferation von Meningeomzellen

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Kultivierung von Zellen

<u>Medien, Zusätze und Chemikalien</u>	<u>Hersteller</u>
fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml Pen, 10.000 µg/ml Strep)	Biochrom AG
DMEM, high Glucose, with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH
Trypsin-EDTA (1x)	PAA Laboratories GmbH
Dulbecco's PBS with Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH
DMSO	SIGMA-ALDRICH
Ethanol	Carl Roth GmbH
Insulin 40 I.U./ml	Aventis
Rosiglitazon maleat	Alexis
<u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Sterilbank	Holten LaminAir
Wasserbad	GFL
Brutschrank	Heraeus BBD 6220
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Axiovert 25
Pipetten 0,5 – 1000 µl	Eppendorf
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
15 ml und 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturflaschen 75cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturschalen, 60 und 100 mm Durchmesser	Greiner Bio-One GmbH
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Kryoröhrchen	Nalgene

#### 4.1.2 Indirekte Immunfluoreszenz

<u>Chemikalien und fertige Lösungen</u>	<u>Hersteller</u>
Paraformaldehyd	Braunschweig Chemie
Triton X-100	Carl Roth GmbH
FCS	PAA Laboratories GmbH
PBS	PAA Laboratories GmbH
DAPI VECTASHIELD Mounting Medium	Vector Laboratories
<u>Antikörper</u>	<u>Hersteller</u>
Anti-PPAR-γ (E-8) mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz
Anti-Aktin rabbit monoclonal IgG	Sigma
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG	Invitrogen
<u>hergestellte Lösungen</u>	<u>Herstellung</u>
4%ige Paraformaldehydlösung	10 g Paraformaldehyd, 112,5 ml A. dest. (auf 70

	°C erhitzen), 30 µl 10 M Natronlauge (auf Eis stellen), 125 ml Natriumphosphatpuffer, pH mit Natronlauge auf 7,4 einstellen
5%ige Triton X-100 Lösung	5 ml Triton X-100 + 99 ml PBS
Primärantikörper-Lösung	499 µl PBS mit 2% FCS + 0,5% Triton X-100, 1 µl Antikörper (1:300 Verdünnung)
Sekundärantikörper-Lösung	499 µl PBS mit 2% FCS, 0,5% Triton X-100, 1 µl fluoreszenzmarkierter Antikörper (1:500 Verdünnung)
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss AxioVision

#### 4.1.3 Proteinisolation aus Zellen und Gewebe

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Tris	Carl Roth GmbH
NaCl	Carl Roth GmbH
EGTA	Carl Roth GmbH
Sucrose	Carl Roth GmbH
DTT	Carl Roth GmbH
PMSF	Carl Roth GmbH
EDTA	Carl Roth GmbH
Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	SIGMA
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	SIGMA
Leupeptin	SIGMA
Aprotinin	SIGMA
Triton X-100	Carl Roth GmbH
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Waage - CP323S – OCE	Sartorius
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Alufolie	Carl Roth GmbH
Zellschaber	BD Falcon
pH Meter WTW pH 720	inoLab
<b><u>Lysispuffer für Zellen</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>
Hypotonischer Lysispuffer:	10 mM HEPES (pH 7,9), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1% NP40 frisch zugeben: 1 mM DTT und Protease-Inhibitor-Mix
High-salt Lysispuffer:	20 mM HEPES (pH 7,9), 800 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol frisch zugeben: 1 mM DTT und Protease-Inhibitor-Mix
Low-salt Lysispuffer:	10 mM HEPES (pH 7,9), 20 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,2 mM EDTA, 25% Glycerol frisch zugeben: 1 mM DTT und Protease-Inhibitor-Mix
<b><u>Lysispuffer für Gewebe</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>
Lysispuffer für Gewebeproben:	20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1mM

	EDTA, 2,5 mM Na-Pyrophosphat, 1% Triton-X100 frisch zugeben: 1 mM Na-Ortho-Vanadat, 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin
--	---

#### 4.1.4 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

<u>Chemikalien und fertige Lösungen</u>	<u>Hersteller</u>
Bradford-Reagenz	BioRad Laboratories
Plastikeinmalküvetten	Sarstedt AG & Co.
<u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u>	<u>Hersteller</u>
Photometer Ultrospec III	Pharmacia Biotech

#### 4.1.5 Western Blot

<u>Chemikalien und fertige Lösungen</u>	<u>Hersteller</u>
Tris HCl	Carl Roth GmbH
SDS	Carl Roth GmbH
APS	Carl Roth GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Acrylamid 30%	Carl Roth GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH
HCl	Carl Roth GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Glycerol	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH
Proteinmarker Biotinylated Ladder	Cell Signaling
Triton X-100	Carl Roth GmbH
Tween 20	SIGMA
ECL Advance Western Blotting Detection Kit Amersham	GE Healthcare
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	PIERCE
<u>Puffer</u>	<u>Herstellung</u>
SDS-Probenpuffer	1 ml Glycerol, 0,5 ml Mercaptoethanol, 3 ml 10%ige SDS-Lösung, 1,25 ml 1 M Tris HCl, 1 mg Bromphenolblau
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris
Sammelgelpuffer pH 6,8	1 M Tris
10%ige SDS-Lösung	50 g SDS mit A. dest. bis auf 500 ml auffüllen
10%ige APS-Lösung	2 g APS mit A. dest. bis auf 20 ml auffüllen
SDS-Laufpuffer (10x)	25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS zusammenmischen und bis auf 1 l mit A. dest. auffüllen
SDS-Laufpuffer (1x)	100 ml SDS-Laufpuffer (10x), 900 ml A.dest.
Blotpuffer (5x)	50 mM Tris, 200 mM Glycin, 1 mM SDS, bis auf 1 L mit A. dest. auffüllen
Transferpuffer	200 ml Blotpuffer (5x), 200 ml Methanol, 600 ml

	A. dest.		
TBS (10x)	20 mM Tris, 500 mM NaCl, bis auf 1 L mit A. dest. auffüllen, pH 7,8 mit HCl einstellen		
T-TBS	100 ml TBS (10x) mit 900 ml A. dest., 1 ml Tween 20		
<b><u>Sammelgel</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>		
3 ml 5%iges Sammelgel	2,1 ml H <sub>2</sub> O, 0,5 ml 30%iges Acrylamid, 0,38 ml Sammelgelpuffer, 30 µl 10%iges SDS, 30 µl 10%iges APS, 3 µl TEMED		
<b><u>Trenngel</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>		
15 ml 10%iges Trenngel	5,9 ml H <sub>2</sub> O, 5 ml 30%iges Acrylamid, 3,8 ml Trenngelpuffer, 150 µl 10%iges SDS, 150 µl 10%iges APS, 6 µl TEMED		
<b><u>Antikörper</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>		
PPAR-γ (E-8) mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz		
Aktin rabbit monoclonal IgG	Sigma		
Anti-mouse monoclonal IgG	Santa Cruz		
Anti-rabbit monoclonal IgG	Sigma		
Anti-Biotin	Santa Cruz		
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>		
Elektrophorese- und Blotkammer, Netzteil PowerPac HC, Glasplatten und anderes Zubehör	im Set von BioRad Laboratories		
Magnetrührer MR 3001	Heidolph		
Vortex-Genie 2	Scientific Industries		
Schüttler PMR-30	Grant-bio		
Chemilumineszenz-Scanner LAS-3000	Fujifilm		
pH-Meter WTW pH 720	inoLab		
Heizblock DB 3D Teche	Dri-Block®		
Waage - CP323S - OCE	Sartorius		
<b><u>Probenmaterialien</u></b>			
<b><u>Zelllinien</u></b>	<b><u>Beschreiber</u></b>		
BenMen-1	WHO Grad I	(Puttmann et al. 2005)	
HBL52	WHO Grad I	Cell lines service, Heidelberg, Germany	
IOMM-Lee	WHO Grad II/III	(Surace et al. 2004)	
KT21MG1	WHO Grad II/III	(Tanaka et al. 1989)	
SF3061	WHO Grad II/III	(Cuevas et al. 2005)	
F5	WHO Grad II/III	(Cuevas et al. 2005)	
<b><u>Gewebeproben</u></b>		<b><u>Patientenalter</u></b>	<b><u>Geschlecht</u></b>
N38/02	WHO Grad I	34	weiblich
555/01	WHO Grad I	55	weiblich
437/99	WHO Grad I	50	weiblich
1353/01	WHO Grad I	62	weiblich
125/98	WHO Grad I	39	weiblich
N1221/97	WHO Grad II	84	weiblich
755/98	WHO Grad II	64	männlich
22/05	WHO Grad III	42	männlich

#### 4.1.6 RNA Isolation

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
RLT-Puffer	Qiagen, Hilden
RWI-Puffer	Qiagen, Hilden
RPE-Puffer	Qiagen, Hilden
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Homogenisator	Kinematica AG

#### 4.1.7 Bestimmung des RNA-Gehaltes

<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Spektrophotometer	NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA

#### 4.1.8 cDNA-Synthese

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Reverse Transcription System	Promega
<b><u>Mastermix für cDNA-Herstellung</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>
10 µl Mastermix:	2 µl RT-Puffer (10 x) 2 µl dNTPs (10mM) 4 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM) 1 µl Oligo dT-Primer (0,5 µg/µl) 0,5 µl RNasin RNase-Inhibitor 0,5 µl AMV-Reverse Transkriptase (10 U/µl)
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
PCR-Cycler UNO II	Biometra

#### 4.1.9 RT-PCR

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
DyNAzyme DNA Polymerase Kit	FINNZYMES
<b><u>Mastermix für PCR</u></b>	<b><u>Herstellung</u></b>
24 µl Mastermix:	19,9 µl H <sub>2</sub> O, nucleasefrei 2,5 µl Puffer (10X) 0,5 µl dNTPs (10mM) 0,5 µl Vorwärts-Primer (10 iM)

		0,5 l Rückwärts-Primer (10 µM) frisch zugeben: 0,1 µl Dynazyme-Polymerase (2 U/µl)	
<u><b>Primer</b></u>		<u><b>Sequenz</b></u>	
β-Aktin	Sense	5'-ACC ACC CCA GCC ATG TAC G-3'	
β-Aktin	Antisense	5'-ATG TCA CGC ACG ATT TCC C-3'	
PPAR-γ	Sense	5'-GAC TTG AAC GAC CAA GTA ACT CT-3'	
PPAR-γ	Antisense	5'-CTT TCG CAG GCT CTT TAG AAA CT-3'	
<u><b>Geräte/Verbrauchsmaterialien</b></u>		<u><b>Hersteller</b></u>	
PCR-Cycler UNO II		Biometra	
<u><b>Gewebeprobe</b></u>		<b>Patientenalter</b>	<b>Geschlecht</b>
1	WHO-Grad I	65	weiblich
2	WHO-Grad I	82	weiblich
3	WHO-Grad I	57	männlich
4	WHO-Grad I	74	männlich
5	WHO-Grad I	63	weiblich
6	WHO-Grad I	55	männlich
7	WHO-Grad I	42	weiblich
8	WHO-Grad II	39	weiblich
9	WHO-Grad III	75	weiblich
10	WHO-Grad III	45	männlich

#### 4.1.10 Agarosegel-Elektrophorese

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>		<b><u>Hersteller</u></b>
Agarose 3:1		amresco
TBE-Puffer (10x)		Invitrogen
Ethidiumbromid		Carl Roth GmbH
Ladepuffer (6x)		Invitrogen
DNA ready to Use Marker		FINNZYMES
<b><u>2%iges Agarose-Gel</u></b>		<b><u>Herstellung</u></b>
kleines Gel		40 ml TBE 0,8 g Agarose 1,4 µl Ethidiumbromid
großes Gel		120 ml TBE 2,4 g Agarose 4,2 µl Ethidiumbromid
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>		<b><u>Hersteller</u></b>
Mikrowelle		AEG
Elektrophoresekammer Agal Mini		Biometra
Netzteil - EPS 301		amersham pharmacia biotech
ImageMaster VDS		Pharmacia Biotech
Waage - CP323S - OCE		Sartorius
Vortex - Genie 2		Scientific Industries



#### 4.1.11 Proliferations-Assay

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescent)	Roche
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
96 well Platte - lichtundurchlässig	nunc
Luminometer	BMG, LUMIstar galaxy
Mehrkanalpipette	Eppendorf

#### 4.1.12 MTT-Assay

<b><u>Chemikalien und fertige Lösungen</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
MTT-Kit	Chemicon
<b><u>Geräte/Verbrauchsmaterialien</u></b>	<b><u>Hersteller</u></b>
96 well Platte - transparent	nunc
Absorptionsspektrometer	BMG, Fluorostar galaxy

### 4.2 Methoden

#### 4.2.1 Zellkulturen

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt, um Kontaminationen mit Mikroorganismen zu vermeiden. Die Zellkulturflaschen bzw. –schalen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchte inkubiert. Als Medium diente für alle verwendeten Zelllinien DMEM, high Glucose, welches mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin versetzt wurde. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die verschiedenen Zelllinien ein- bis zweimal pro Woche umgesetzt und gesplittet. Das Teilungsverhältnis wurde individuell nach Zelllinie und Zelldichte gewählt. Hierzu wurde die Konfluenz der adhärent wachsenden Zellen unter dem Lichtmikroskop beurteilt und auf Kontaminationen hin überprüft.

Um die Zellen Passagieren und Teilen zu können, wurde zunächst das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche abgesaugt und verworfen. Verbliebene Mediumreste und abgestorbene Zellen wurden durch Waschen mit 5 ml PBS entfernt. Es folgte die Zugabe von 3 ml der Protease Trypsin und eine fünfminütige Inkubation.

Nach dieser Zeit begann sich der Zellrasen vom Boden der Kulturflasche zu lösen, was durch leichtes Klopfen beschleunigt wurde. Anschließend wurden 6 ml PBS zugegeben, um das Trypsin zu inaktivieren und dann für 5 min bei 1100 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen, das Pellet in 1 ml neuem Medium gelöst. Ein definierter Teil dieser Zellsuspension wurde in eine frische Zellkulturflasche überführt und mit Medium auf ein Endvolumen von 20 ml aufgefüllt. Bei nicht ausreichender Zelldichte wurde lediglich das Medium regelmäßig gewechselt, die Zellen jedoch nicht geteilt.

#### 4.2.1.1 Zellzahlbestimmung

Sofern erforderlich erfolgte die Zellzahlbestimmung mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer. Zunächst wurden die Zellen hierzu wie beim Passagieren aus der Zellkulturschale gelöst und das nach dem Zentrifugieren entstandene Pellet je nach Größe in 1 bis 10 ml Medium (M) suspendiert. Anschließend wurden 100 µl dieser Lösung abgenommen und in einem Eppendorf-Gefäß mit 300 µl Medium vermischt. 10 µl davon wurden nun auf die Neubauer Zählkammer pipettiert und das entsprechende Deckglas aufgesetzt. Aus den in den vier Quadranten ausgezählten Zellen wurde ein Mittelwert (Z) gebildet und dieser in die unten stehende Formel eingesetzt. Je nach der gewünschten Anzahl (A) an Zellen pro ml wurde die ursprüngliche Zellsuspension dann mit Medium auf das errechnete Volumen (X) in ml aufgefüllt.

$$X = \frac{Z * 10^4 * M}{A}$$

#### 4.2.2 Stimulation der Zellen

Im Rahmen der Stimulationsversuche wurden die benigne Zelllinie BenMen-1 und die maligne Zelllinie IOMM-Lee verwendet. Für die Insulinstimulation wurden pro Ansatz  $1 \times 10^6$  Zellen in 4 ml Medium in kleine Zellkulturschalen, für die Stimulation mit Rosiglitazon jeweils  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium in große Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht inkubiert.

##### 4.2.2.1 Insulin

Um die Frage zu klären, ob sich die PPAR- $\gamma$ -Expression durch Insulin induzieren lässt, wurden beide Zelllinien mit unterschiedlichen Konzentrationen Insulin stimuliert. Zunächst wurde hierfür das normale, serumhaltige Medium von den Zellkulturschalen abgesaugt, durch serumfreies Medium ersetzt und die Zellen dann für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Insulin in aufsteigenden Konzentrationen von 100 nM, 200 nM, 400 nM und 800 nM zugegeben. Ansätze ohne Insulin mit serumhaltigem und serumfreiem Medium dienten als Kontrollen. Nach 24 h bzw. 72 h wurden die Proteine der derart behandelten Zellen isoliert.

##### 4.2.2.2 PPAR- $\gamma$ -Agonisten

Rosiglitazon gehört zur Gruppe der Glitazone, welche synthetische Agonisten von PPAR- $\gamma$  darstellen. Obwohl der genaue Wirkmechanismus bisher noch immer ungeklärt ist, wurden diese Stoffe bereits seit geraumer Zeit zur Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. Vor Versuchsbeginn wurde Rosiglitazon in einer Konzentration von 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  in Ethanol aufgelöst und in lichtundurchlässigen Röhrchen aufbewahrt. Den beiden Zelllinien BenMen-1 und IOMM-Lee wurde dann Rosiglitazon in aufsteigenden Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Um unerwünschte Effekte von Ethanol beurteilen zu können, wurden parallel Zellen mit dem gleichen Volumen Lösungsmittel behandelt wie in den Ansätzen mit 20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon enthalten. Als Kontrolle dienten Ansätze ohne jegliche Zusätze. Die Proteine wurden nach einer Inkubationszeit von 48 h isoliert.

#### 4.2.3 Indirekte Immunfluoreszenz

Immunhistochemische Verfahren ermöglichen Proteine in Zellen mit Hilfe von Antikörpern sichtbar zu machen. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein spezifischer, sogenannter Primärantikörper an ein bestimmtes Protein-Epitop. Ein anschließend zugegebener Fluorochrom-gekoppelter zweiter Antikörper (Sekundärantikörper) bindet dann an den Primärantikörper. Die Detektion der entstehenden Protein-Antikörper-Komplexe erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

Zunächst wurden sterile Objektträger in jeweils eine Kulturschale gelegt, die 10 ml 37°C warmes Medium enthielt. Anschließend wurden  $10^6$  Zellen der Linien BenMen-1 und IOMM-Lee zugegeben und gleichmäßig verteilt. Die Kulturschalen wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Sobald die Zellen adhärent und in gewünschter Dichte auf den Objektträgern angewachsen waren, wurde das Medium abgesaugt und die Objektträger zweimal in einer Glaskammer mit PBS gewaschen. Zur Fixierung wurde nun je 1 ml 4%iger Paraformaldehydlösung auf die abgetropften Objektträger pipettiert. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und die Objektträger erneut zweimal mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von je 1 ml 5%iger Triton X-100-Lösung auf die abgetropften Objektträger. Der Überstand wurde nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur abgesaugt. Nun wurde je 1 ml einer Lösung mit 2% FCS und 0,5% Triton X-100 in PBS zugegeben und 15 min inkubiert. Nach Absaugen des Überstandes erfolgte die Zugabe des Primärantikörpers, der in selbiger Lösung gelöst war. Auf jeweils einen Objektträger pro Zelllinie wurden die Antikörperlösungen in einer Verdünnung von 1:300 aufgebracht. Auf einen Objektträger pro Zelllinie wurde zur Negativkontrolle nur die reine Lösung aus 2% FCS und 0,5% Triton X-100 in PBS pipettiert. Die derart behandelten Objektträger wurden über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach Entfernung des Überstandes und dreimaligem Waschen konnte dann der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper, ebenfalls gelöst in 2% FCS und 0,5% Triton X-100 in PBS, in einer Verdünnung von 1:500 zugegeben werden. Es folgte eine einstündige Inkubation bei 37°C im Dunkeln, an die sich wiederum die Entfernung des Überstandes und dreimaliges Waschen mit PBS anschlossen. Abschließend wurden die getrockneten Objektträger mit je einem Tropfen Vectashield Mounting Medium mit DAPI und einem Deckgläschen eingedeckt. Bei DAPI handelt es sich um einen blau-violett emittierenden Fluoreszenzfarbstoff,

welcher sich an DNA anlagert und auf diese Weise Zellkerne anzufärben vermag. Im Verlauf konnten die Objektträger entweder sofort in der Fluoreszenzeinstellung des Zeiss Axio Vision Fluoreszenzmikroskops ausgewertet werden oder zur Langzeitaufbewahrung in einem lichtundurchlässigen Behältnis bei 4°C gelagert werden.

#### 4.2.4 Proteinisolation

##### 4.2.4.1 Proteinisolation aus Zellen

Um die Proteine aus den Zellkulturen zu isolieren, wurde zunächst das Medium abgesaugt und je nach Größe der Kulturschale 1 bis 3 ml kaltes PBS zugegeben. Der Zellrasen wurde nun mit einem Zellschaber abgelöst und die Zellsuspensionen in Röhrchen überführt. Die Schalen wurden mit weiteren 1 bis 6 ml kaltem PBS nachgewaschen, welches ebenfalls in genannte Röhrchen überführt wurde. Nach Zentrifugieren für 10 Minuten bei 4°C und 2000 rpm wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden je nach Größe in 60 bis 200 µl hypotonischem Lysispuffer resuspendiert, in 1,5 ml Röhrchen überführt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde wiederum für 10 Minuten bei 4°C und 3000 rpm zentrifugiert und anschließend die Überstände als cytoplasmatische Lysate abpipettiert und bei -80°C weggefroren. Die Pellets wurden in jeweils gleichem Volumen an High-salt-Lysispuffer und Low-salt-Lysispuffer aufgenommen, wobei deren Volumen je der Hälfte dessen an vorher zugegebenem hypotonischem Lysispuffer entsprach. Die weiterhin auf Eis stehenden Proben wurden, nach kurzem Mischen auf dem Vortexmixer, dreimal für 10 sec sonifiziert und weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde als nukleäres Lysat abgenommen und eingefroren.

##### 4.2.4.2 Proteinisolation aus Gewebe

Die gefrorenen Gewebeproben wurden gewogen und umgehend auf flüssigem Stickstoff zwischengelagert. Mörser und Pistill wurden mit verstärkter Alufolie ummantelt und ebenfalls auf flüssigen Stickstoff verbracht. In diesem Milieu wurden

die Proben zermörsert, anschließend in neue 1,5 ml Röhrchen gegeben und sofort mit Lysispuffer in dreifacher Menge der abgewogenen Probenmassen versetzt. Danach wurden die Proben gevortext, in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Dies ermöglicht den Proteinausfall. Der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Nachdem die Proben für 30 Minuten bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert wurden, konnten die das Protein enthaltenden Überstände in neue Röhrchen überführt werden. Diese wurden bei -80°C eingefroren und später weiterverarbeitet.

#### 4.2.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Diese Methode beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau an positiv geladene Proteine, wobei sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm auf 595 nm verändert. Der zustande kommende Farbumschlag kann durch ein Photometer erfasst und vergleichend mit einer Standardreihe mit bekannter Proteinkonzentration quantifiziert werden.

Dazu wurden Küvetten mit jeweils 800 µl Aqua dest., 200 µl Bradford-Reagenz von BioRad Laboratories und 2 µl der zu bestimmenden Probe bestückt und der Inhalt mit Hilfe einer Pipette durchmischt. Nach einer fünf-minütigen Inkubationszeit wurde die Absorption am Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen, wobei zum Normieren ein proteinfreier Ansatz als Nullkontrolle diente.

#### 4.2.5 Western Blot

Bei diesem Verfahren werden Proteine auf eine Trägermembran aus Nitrocellulose übertragen (geblottet) und mittels einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Auf diese Weise können bestimmte Proteine und deren Expressionsspiegel beurteilt werden. Zunächst wird jedoch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Vorbereitend hierfür werden die spezifische Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur der Proteine durch die Zugabe von Mercaptoethanol und Erhitzen der Proben auf 95°C zerstört, sodass diese als Polypeptide vorliegen. Für die hier angewandte diskontinuierliche SDS-PAGE werden die derart vorbehandelten Proteinproben auf ein großporiges Sammelgel aufgetragen, welches sich in einer mit SDS-haltigem Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer befindet. Nach Anlegen

der elektrischen Spannung wandern die Proteine durch das sich anschließende kleinporige Trenngel, wobei Proteine mit geringem Molekulargewicht schneller wandern als solche mit hohem Molekulargewicht. Die Porengröße der Gele ist dabei abhängig von der Konzentration an Acrylamid und liegt zwischen 3 und 6 nm.

Als nächster Schritt folgt das Blotten. Dabei werden die Proteine wiederum durch Anlegen eines elektrischen Feldes von dem Acrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Bindung der Proteine erfolgt durch hydrophobe Wechselwirkungen an der Membran. Alle weiteren Bindungsstellen der Membran werden durch andere Proteine, in diesem Fall Magermilchpulver, blockiert. Im Folgenden bindet ein spezifischer Primärantikörper an die fixierten Proteinstrukturen und an diesen bindet wiederum ein z.B. peroxidasegekoppelter Sekundärantikörper. Während der Inkubation mit ECL katalysiert die Peroxidase die Umwandlung des darin enthaltenen Luminol in dessen oxidierte Form. Dabei entstehen Phenole, welche die Lumineszenz um das 1000-fache verstärken. Bei der Detektion dieser Lumineszenz ergeben sich Banden, die spezifisch für das gesuchte Protein und dessen Größe sind.

Einheitliche Mengen Protein (20 bis 100 µg) wurden mit jeweils 5 µl SDS-Probenpuffer in ein 0,5 ml Eppendorf-Gefäß pipettiert, dieses dann gevortext, zentrifugiert und 5 min bei 95°C in den Heizblock gestellt. Die denaturierten Proben wurden dann zusammen mit 3,5 µl Marker als Größenstandard in die Geltaschen des Sammelgels aufgetragen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer mit SDS-Laufpuffer (1x) gefüllt und für ca. 90 min eine Spannung von 120 V angelegt. Für sämtliche Proben wurden 10%ige Acrylamidgele verwendet.

Nach der Elektrophorese wurde das Sammelgel abgetrennt und verworfen, das Trenngel hingegen auf eine in Transferpuffer getränkte Nitrocellulosemembran gelegt. Diese wurde zusammen mit zwei Filterpapieren und zwei Schwämmen in die Blotkammer eingelegt, wobei die Richtung so gewählt wurde, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf die Membran übertragen wurden. Die Blotkammer wurde zusätzlich mit einem Eispack bestückt und anschließend mit 4°C kaltem Transferpuffer gefüllt. Nach einstündigem Blotten bei einer Stromstärke von 500 mA wurde die Membran für 1 h mit einer 5%igen Lösung aus T-TBS und Magermilchpulver zum Blockieren auf einem Schüttler platziert. Nachdem diese Lösung abgeschüttet worden war, wurde der jeweilige Primärantikörper in einer

Konzentration von 1:300 für PPAR $\gamma$  bzw. 1:1.000 für Aktin in 1%iger Milchpulverlösung zugegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C zur Inkubation auf einen Schüttler gestellt. Am Folgetag wurde die Antikörperlösung abgegossen und die Membran einmal für 15 min und dreimal für 5 min in T-TBS auf dem Schüttler gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 1 h mit Anti-Biotin-Antikörper in einer Konzentration von 1:2.000 und dem entsprechenden Sekundärantikörper in 1%iger Milchpulverlösung inkubiert (1:5.000 goat anti-mouse für PPAR $\gamma$  bzw. 1:10.000 goat anti-rabbit für Aktin). Danach wurde der Waschvorgang, wie oben beschrieben, wiederholt. Die Membran wurde dann unter Lichtabschluss für 5 min mit ECL-Lösung inkubiert und anschließend in einem Chemilumineszenz-Scanner entwickelt.

Um weitere Proteine auf derselben Membran darstellen zu können, wurde diese zunächst gestrippt („*stripping*“, engl.: herunter waschen). Hierfür wurde die Membran in ein Behältnis mit 10 ml Restore<sup>TM</sup> Stripping Puffer gelegt und dieses für 45 min in ein 54°C warmes Wasserbad gestellt. Nachdem die Membran dann wiederum mit 5%igem Magermilchpulver blockiert worden war, konnten neue Primärantikörper zugegeben werden. Alle weiteren Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

#### 4.2.6 RNA-Isolation

Zunächst werden hierfür die Zellmembranen lysiert und die freiwerdende RNA an eine Silicagelmembran gebunden. Gleichzeitig werden RNasen durch das Salz Guanidinisothiocyanat inaktiviert. Bei diesem Verfahren werden lediglich RNA-Moleküle isoliert, die eine Größe von mehr als 200 Nukleotiden aufweisen. Auf diese Weise werden kleine RNA-Moleküle wie tRNA selektiv ausgeschlossen und die gewünschte mRNA angereichert. Die Eluierung der RNA erfolgt anschließend mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest.

Es wurde mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen gearbeitet. Zu Beginn wurden die Pellets der abzentrifugierten Zelllinien in 600  $\mu$ l RTL-Puffer mit 1% Mercaptoethanol gelöst. Dann wurde das Zelllysate in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bei 14.000 rpm 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 600  $\mu$ l 70%igem Ethanol vermischt und anschließend auf separate RNeasy-Säulen pipettiert. Nach Zentrifugieren der Säulen für 15 sec bei 10.000 rpm



wurden diese mit je 700 µl des mitgelieferten RWI-Puffers befüllt und erneut 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. 500 µl RPE-Puffer, welcher vor Gebrauch nach Herstelleranleitung mit Ethanol aufgefüllt worden war, wurden nun zum Waschen auf jede Säule aufgebracht und diese für weitere 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurden nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säulen pipettiert und eine zweiminütige Zentrifugierung bei 10.000 rpm vorgenommen. Abschließend wurden je 30 µl RNase-freies Wasser auf die Säulen gegeben, für 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und somit die RNA aus den RNeasy-Säulen eluiert.

Um RNA aus Gewebe zu isolieren, wurde dieses zunächst in tiefgefrorenem Zustand mit einem Skalpell zerkleinert, wobei insgesamt nicht mehr als 30 mg pro Probe verarbeitet wurden. Die Gewebstücke wurden dann in einem Gefäß mit 600 µl Lysepuffer versetzt und mittels eines Homogenisators weiter zerkleinert. Das Lysat wurde zentrifugiert, der Überstand mit 600 µl 70%igem Ethanol vermischt und dieses im Anschluss auf die RNeasy-Säule aufgebracht. Sämtliche weitere Schritte erfolgten wie oben beschrieben.

#### 4.2.6.1 Bestimmung des RNA-Gehaltes

Der RNA-Gehalt der Proben wurde mit einem Spektrophotometer bei einer Absorption von 260 nm bestimmt. Zur Reinheitsmessung wurden sowohl das A260/A230-Verhältnis (RNA/organische Verbindungen) als auch das A260/A280-Verhältnis (RNA/Proteine) genutzt. Da alle gemessenen Werte über 2,0 bzw. über 1,9 lagen, konnten Verunreinigungen durch organische Verbindungen bzw. Proteine ausgeschlossen werden. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

#### 4.2.7 cDNA-Synthese

Bei der Reversen Transkription kann RNA mit Hilfe der Reversen Transkriptase, eines viralen Enzyms, in komplementäre DNA (=cDNA) umgeschrieben werden. Alle vorbereitenden Arbeitsschritte wurden dabei auf Eis ausgeführt. Zuerst wurde ein Probenvolumen, welches einer Masse von 1 µg RNA entsprach, mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt, sodass ein Gesamtvolumen von 10 µl entstand. Nachfolgend wurden 10 µl Mastermix des Reverse Transcription Kits zu allen Proben

hinzupipettiert, diese umgehend in den PCR-Cycler verbracht und das entsprechende Programm (**Tabelle 3**) gestartet.

**Tabelle 3:** PCR-Programm zum Umschreiben von RNA in cDNA

Programm:	70°C - 10 min
	42°C - 60 min
	95°C - 5 min
	Deckelheizung: 42°C

#### 4.2.8 Polymerasekettenreaktion – RT-PCR

Mit Hilfe dieses Verfahrens können DNA-Fragmente spezifisch vervielfältigt werden. Um untersuchen zu können, ob das PPAR $\gamma$ -Gen in den Zellkernen von Meningeomzellen abgelesen und transkribiert wird, musste zunächst die mRNA aus den Zellen gewonnen und die normale DNA eliminiert werden. Durch Reverse Transkription konnte die mRNA anschließend wie oben beschrieben in cDNA umgeschrieben und mittels PCR vervielfältigt werden. Der zu amplifizierende DNA-Abschnitt wird dabei durch das eingesetzte Primerpaar festgelegt. Bei Primern handelt es sich um Oligodesoxynukleotide mit einer Länge von 15 bis 30 Basen. Sie lagern sich sequenzspezifisch an den zu amplifizierenden DNA-Einzelstrang an, wodurch ein kurzer Abschnitt doppelsträngiger DNA mit einem freien 3'-OH-Ende entsteht. Dieser wiederum dient der DNA-Polymerase als Startpunkt. Der Vorwärts-Primer bindet hierbei an den Antisense-Strang, der Rückwärts-Primer hingegen an den Gegenstrang, den sogenannten Sense-Strang. Zu Beginn des PCR-Cycles werden die beiden Stränge der zu amplifizierenden DNA durch mehrminütige Denaturierung bei 95°C voneinander getrennt. Die sich daran anschließenden drei Schritte der Denaturierung, Anlagerung (Annealing) und Elongation folgen zyklisch aufeinander. Durch die bei 95°C stattfindende Denaturierung werden die neu entstandenen DNA-Doppelstränge jeweils wieder in Einzelstränge aufgetrennt. An diese Einzelstränge lagern die Primer während der Anlagerungsphase durch komplementäre Basenpaarung an. Die dann folgende Elongation findet bei 72°C statt, was dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase entspricht. Diese verlängert den neu entstehenden Strang in 5'-3'-Richtung und führt so zur Entstehung eines

neuen DNA-Doppelstranges. Danach folgen wieder die Denaturierung und die Wiederholung des Zyklus. Der Begriff der Kettenreaktion gründet sich nun auf die Tatsache, dass die Produkte vorheriger Zyklen als Ausgangsstoffe für den nächsten Zyklus dienen und somit eine exponentielle Vervielfältigung mit Verdoppelung nach jedem Zyklus ermöglichen. Die vervielfältigten cDNA-Abschnitte werden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und einer Elektrophorese unterzogen. Abschließend wird das Gel unter UV-Licht ausgewertet.

Zuerst wurde der Mastermix-Ansatz vorbereitet, die Zugabe der Polymerase jedoch noch nicht vorgenommen. Dann wurden kleine, auf Eis stehende Eppendorfgefäße mit je 1 µl cDNA der zu untersuchenden Probe bestückt. Nach Zugabe der Polymerase zum Mastermix und dessen guter Durchmischung wurden 24 µl davon in jedes Röhrchen pipettiert. Nachdem die Proben durch Vortexen durchmischt und anschließend zentrifugiert worden waren, wurden sie zügig in den PCR-Cycler verbracht und das PCR-Programm (**Tabelle 4**) gestartet. Die Sequenzen der im Mastermix verwendeten Primer sind unter 4.1.9 aufgelistet.

**Tabelle 4:** PCR-Programme für die Amplifikation von  $\beta$ -Aktin und PPAR $\gamma$

Programm für $\beta$ -Aktin:	94°C – 3 min	30 x	} 30 x	Programm	94°C – 3 min
	94°C – 30 s			für PPAR $\gamma$ :	94°C – 20 s
	55°C – 45 s				60°C – 30 s
	72°C – 45 s				72°C – 30 s
	72°C – 5 min				72°C – 5 min

Bei der im Anschluss durchgeführten Agarose-Gelelektrophorese handelt es sich um ein Verfahren zur Auftrennung von Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe. Aufgrund ihrer Phosphatgruppen sind Nukleinsäuren negativ geladen und bewegen sich daher in einem elektrischen Feld entlang eines elektrischen Gradienten. Die Auftrennung wird dadurch ermöglicht, dass kleinere DNA-Stränge leichter als größere durch das Agarosegel hindurch wandern können. Das im Gel enthaltene Ethidiumbromid lagert sich in doppelsträngige Nukleinsäuremoleküle ein und fluoresziert unter Anregung mit UV-Licht, sodass DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden können. Die Größe und damit einhergehend auch die Spezifität des

Amplifikationsproduktes können anhand des mitgeführten Vergleichsstandards bestimmt werden.

Für die Elektrophorese wurden 2%ige Agarose-Gele hergestellt. Dazu wurde die Agarose mit dem TBE-Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen mit Ethidiumbromid versetzt. Die Lösung wurde in eine horizontale Gelkammer gegossen, in die ein Taschenkamm eingesetzt war. Das ausgehärtete Gel konnte nach etwa 30 min in die mit TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer verbracht und bestückt werden. Zu den gekühlten Proben aus der PCR wurden vorher jeweils 5 µl Blaumarker-Puffer pipettiert, wodurch das Absinken der DNA-Lösung in die Geltaschen erleichtert wurde. Außerdem ermöglicht der in diesem Puffer enthaltene Farbstoff Bromphenolblau die Kontrolle des Elektrophoreseverlaufs, da dieser mit den ca. 100 bp langen DNA-Fragmenten im Gel wandert und auf diese Weise die Elektrophoresefront markiert. Jede Geltasche wurde dann mit 20 µl des DNA-Blaumarker-Gemisches bestückt. Als Vergleichsstandard wurden 4 µl einer DNA-Basenpaarleiter aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 100 V für etwa 1,5 Stunden. Direkt im Anschluss wurde das Gel mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt und Fotografien der DNA-Banden angefertigt.

#### 4.2.9 MTT-Assay

Der MTT-Test ist ein Zytotoxizitäts-Test. Der Nachweis der Zellvitalität mittels dieser Methode beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Dabei entspricht die Menge des umgesetzten und letztendlich am Absorptionsspektrometer gemessenen Farbstoffs in etwa der Glykolyserate und damit der Vitalität der Zellen.

Die Zellen der Linien BenMen-1 und IOMM-Lee wurden dazu unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und so eingestellt, dass in eine durchsichtige 96-well-Platte pro Well 10.000 Zellen in 100 µl Medium ausgesät wurden. Nachdem die Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank anwachsen konnten, erfolgte die Zugabe des Rosiglitazons in verschiedenen Konzentrationen und Lösungsmitteln in jeweils drei Parallelen. Als Kontrollen dienten Wells mit reinem Medium mit und ohne Zellen (Negativkontrolle) und zellhaltige Wells mit den entsprechenden Lösungsmitteln.

Nach Inkubation bei 37°C für 48 Stunden wurden pro Well 10 µl MTT zugegeben und durch Schwenken der Platte vermischt. Daran schloss sich eine vierstündige Inkubationszeit bei 37°C an. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Color Development Solution (Isopropanol und HCl) pro Well und gründliches Mischen mit der Pipette. Nach Inkubation für weitere 20 min bei 37°C erfolgte die sofortige Absorptionsmessung am Absorptionsspektrometer bei einer Wellenlänge von 584 nm. Der Versuchsansatz wurde unter identischen Bedingungen dreimal wiederholt und von den Ergebnissen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

#### 4.2.10 Proliferationsassay

Diesem Verfahren liegt der Einbau des Pyrimidinanalogons BrdU (5-Brom-2'-desoxyuridin) in die DNA sich teilender Zellen zugrunde. Dabei wird BrdU an Stelle von Thymidin eingebaut und über einen Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörper im Luminometer messbar gemacht. Dabei ergibt sich eine direkte Proportionalität zwischen der gemessenen Chemilumineszenz und dem in die Zellen eingebauten BrdU.

Zunächst wurden 10.000 Zellen pro well in 100 µl Medium in eine lichtundurchlässige 96-well-Platte ausgesät und über Nacht zum Anwachsen in einen Brutschrank gestellt. Die Bestimmung der entsprechenden Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer vorgenommen. Die Zellen der Linien BenMen-1 und IOMM-Lee wurden dann in jeweils drei Parallelen mit aufsteigenden Konzentrationen des PPARγ-Agonisten Rosiglitazon und verschiedenen Lösungsmitteln behandelt und für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurden 10 µl/well BrdU hinzupipettiert und für weitere 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Alle weiteren Schritte liefen bei Raumtemperatur ab. Die Platte wurde für 2 min bei 800 rpm zentrifugiert und im Anschluss ausgeschlagen, sodass bei der Entfernung des flüssigen Anteils aus den wells keine Zellen mit ausgeschwämmt wurden. Danach wurden die Zellen für 30 min mit 200 µl/well FixDenat behandelt. Nach Entfernen des FixDenat durch Ausschlagen folgte die Zugabe von 100 µl/well Anti-BrdU-Peroxidase. 90 min später wurde die Platte erneut ausgeschlagen und dreimal mit je 200 µl/well Waschpuffer gewaschen. Im letzten Schritt folgte die Zugabe von 100 µl/well angewärmter Substratlösung (Tetramethylbenzidin). Die Platte wurde dann lichtundurchlässig abgedeckt, für 3 min

auf einen Schüttler gestellt und direkt im Anschluss im Lumineszenz-ELISA-Reader ausgemessen. Zur Kontrolle wurden immer wells mit reinem Medium mit und ohne Zellen sowie zellhaltige wells mit den verschiedenen Lösungsmitteln mitgeführt. Der Versuchsansatz wurde unter identischen Bedingungen dreimal wiederholt und von den erhaltenen Ergebnissen Mittelwert und Standardabweichung bestimmt.

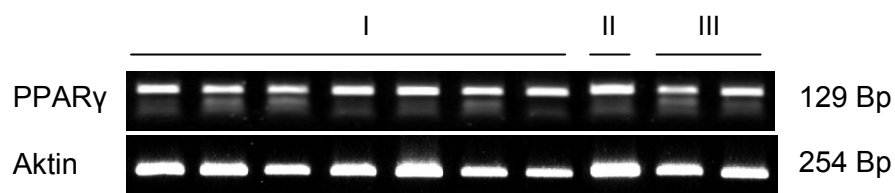
#### 4.2.11 Statistische Auswertung

Die im MTT- und Proliferations-Assay erhaltenen Werte wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes SPSS 18 in allen Fällen mittels eines Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben auf signifikante Unterschiede untersucht. Die in den Abbildungen 15 bis 18 dargestellten Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung angegeben.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 PPAR- $\gamma$ Expression in humanen Meningeomen

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen der Expression von PPAR $\gamma$  und dem WHO-Grad von humanen Meningeomen darzustellen, wurde mRNA von zehn humanen Meningeomen in cDNA umgeschrieben und einer RT-PCR unterzogen. Die Gewebe stammten von 6 weiblichen und 4 männlichen Patienten, das durchschnittliche Patientenalter lag bei 59,7 Jahren. Untersucht wurden 7 WHO-Grad I, 1 WHO-Grad II und 2 WHO-Grad III Meningeome. Angenommen wurde, dass eine verminderte Expression von PPAR $\gamma$  eine tumorproliferative Wirkung zeigen könnte und PPAR $\gamma$  dementsprechend vermindert in atypischen und malignen Meningeomen exprimiert würde. Im unten dargestellten Agarosegelbild in **Abbildung 5** ist zu sehen, dass die Banden nicht mit dem WHO-Grad korrelieren. Dabei konnte PPAR $\gamma$  jedoch eindeutig in allen untersuchten Tumorproben nachgewiesen werden.

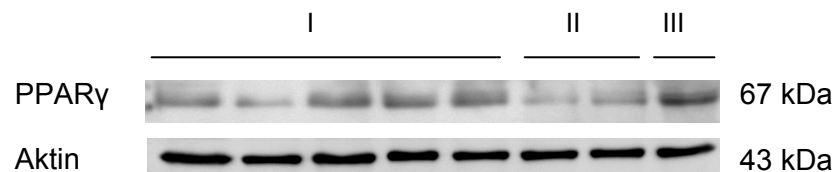


**Abbildung 5:** RT-PCR zum Nachweis von PPAR $\gamma$ -mRNA in humanen Meningeomen der WHO-Grade I, II und III.

Um diesen Zusammenhang auch posttranskriptionell auf Proteinebene zu beleuchten, wurden acht Gewebeproben unterschiedlicher WHO-Grade mittels Western Blot untersucht. Es wurden 5 WHO-Grad I, 2 WHO-Grad II und 1 WHO-Grad III Meningeom analysiert. Die Gewebe stammten von 6 weiblichen und 2 männlichen Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 53,8 Jahren.

In **Abbildung 7** ist zu ersehen, dass sich die 67 kDa großen Banden für PPAR $\gamma$  nicht in Korrelation zum WHO-Grad unterscheiden. Die Banden der WHO-Grad II Meningeome sind hier im Vergleich deutlich schwächer als die von vier der fünf Meningeome des WHO-Grad I. Die Bande des WHO-Grad III Meningeoms ist zwar ebenfalls nicht deutlich stärker ausgeprägt als die der WHO-Grad I Meningeome,

allerdings stärker als die der WHO-Grad II Proben. In keinem Fall stellte sich jedoch eine eindeutige Abnahme der Bandenstärke von PPAR $\gamma$  mit steigendem Grad der Malignität dar. Somit konnte auch hier kein Zusammenhang zwischen der Expression von PPAR $\gamma$  und der Malignität der Meningeome festgestellt werden.



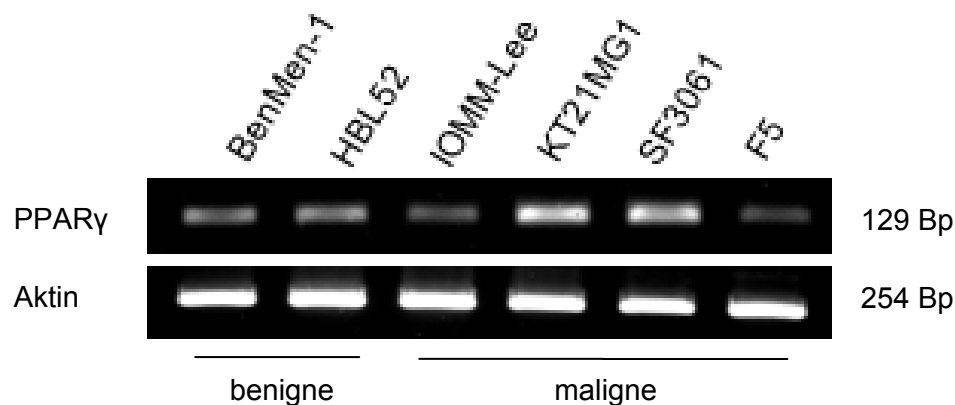
**Abbildung 6:** Western Blot PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen WHO-Grad I, II und III.

## 5.2 PPAR- $\gamma$ Expression in humanen Meningeomzelllinien

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen exprimiert wird, wurden weitere Untersuchungen zur Regulation der PPAR $\gamma$  Expression durchgeführt. Hierfür standen sechs humane Meningeomzelllinien zur Verfügung, von denen zwei als benigne und vier als maligne einzustufen sind. Diese wurden auf mRNA- und Proteinebene auf die Expression von PPAR $\gamma$  untersucht.

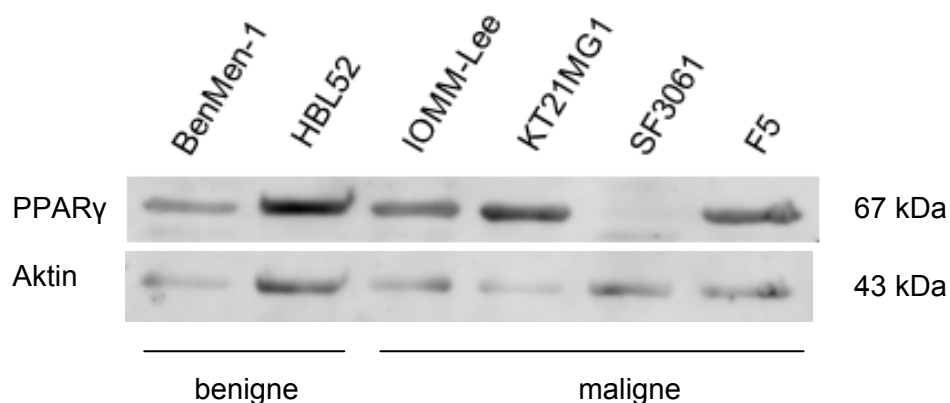
Aus **Abbildung 7** geht hervor, dass die mRNA für PPAR $\gamma$  in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird. Es lässt sich jedoch keine Korrelation zwischen Malignitätsgrad und PPAR $\gamma$  Expression feststellen. So sind die Banden der malignen Zelllinien KT21MG1 und SF3061 stärker ausgeprägt, als die der benignen Zelllinien BenMen-1 und HBL52, die Bandenstärke von IOMM-Lee und F5 (maligne) sind vergleichbar schwach wie die der benignen Zelllinien. Es konnte jedoch in allen Proben eindeutig PPAR $\gamma$  nachgewiesen werden.





**Abbildung 7:** RT-PCR PPAR $\gamma$  von zwei benignen (HBL52 und BenMen-1) und vier malignen Zelllinien.

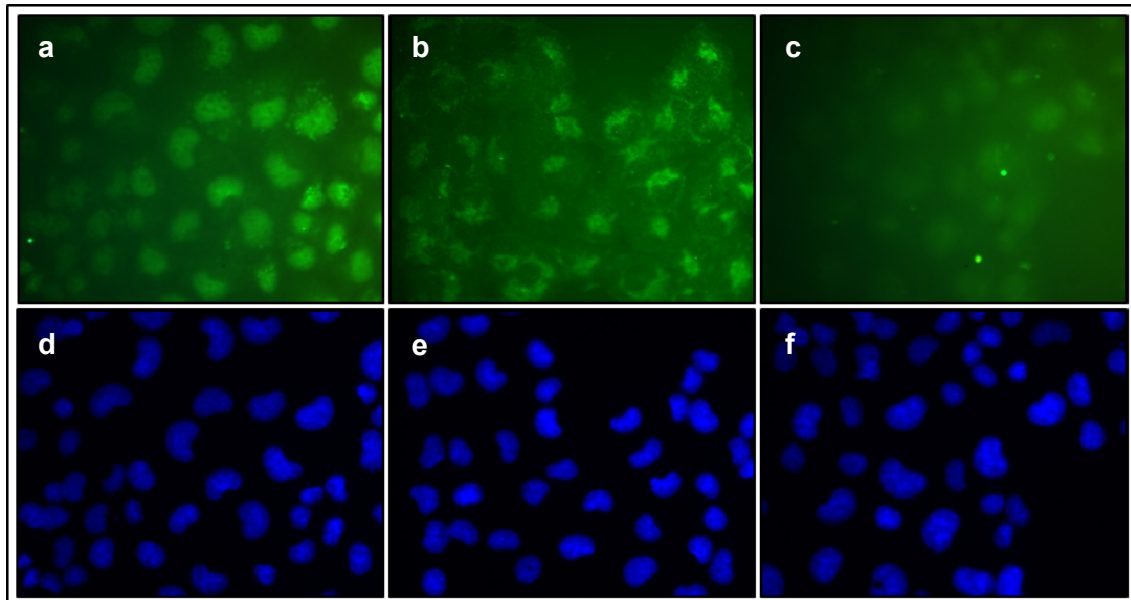
Da posttranskriptionell verschiedene Regulationsmechanismen existieren, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie viel PPAR $\gamma$  tatsächlich translatiert wird. Dazu wurden die Proteinlysate der Zellen einer Gelelektrophorese unterzogen und dann im Western Blot dargestellt. Dieser ist in **Abbildung 8** zu sehen und zeigt die unterschiedlichen Expressionslevel von PPAR $\gamma$  in den einzelnen Zelllinien. Auch hier kann kein Zusammenhang zwischen Malignität und PPAR $\gamma$ -Expression hergeleitet werden.



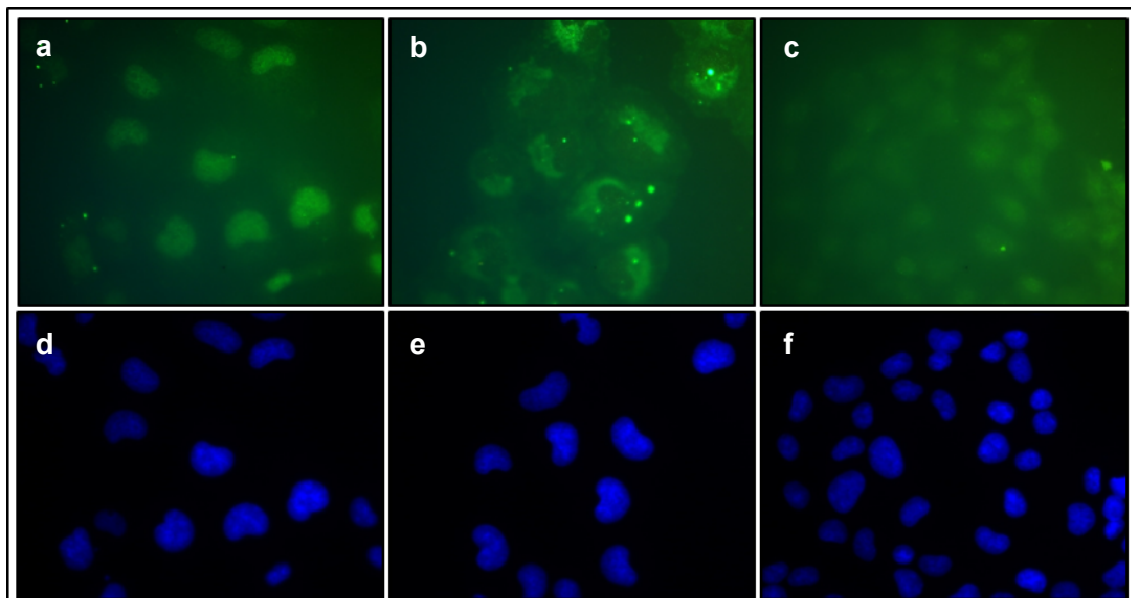
**Abbildung 8:** Western Blot PPAR $\gamma$  von zwei benignen und vier malignen Zelllinien.

Die benigne Zelllinie BenMen-1 und die maligne Zelllinie IOMM-Lee wurden aufgrund ihres sehr ähnlichen Wachstums und der vergleichbaren PPAR $\gamma$ -Expressionslevel für weitere Versuche ausgewählt.

Wie in der Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinien BenMen-1 und IOMM-Lee zu sehen (**Abbildung 9 und 10**), ist PPAR $\gamma$  ein Protein, welches sich im Zellkern befindet.



**Abbildung 9:** Immunfluoreszenz PPAR $\gamma$  der Zelllinie BenMen-1  
Inkubiert mit **a:** 1:300 PPAR $\gamma$ -Antikörper, **b:** 1:300 Aktin-Antikörper, **c:** Negativkontrolle ohne Primärantikörper, zugehörige DAPI-Bilder jeweils darunter.



**Abbildung 10:** Immunfluoreszenz der Zelllinie IOMM-Lee  
Inkubiert mit **a:** 1:300 PPAR $\gamma$ -Antikörper, **b:** 1:300 Aktin-Antikörper, **c:** Negativkontrolle ohne Primärantikörper, zugehörige DAPI-Bilder jeweils darunter.

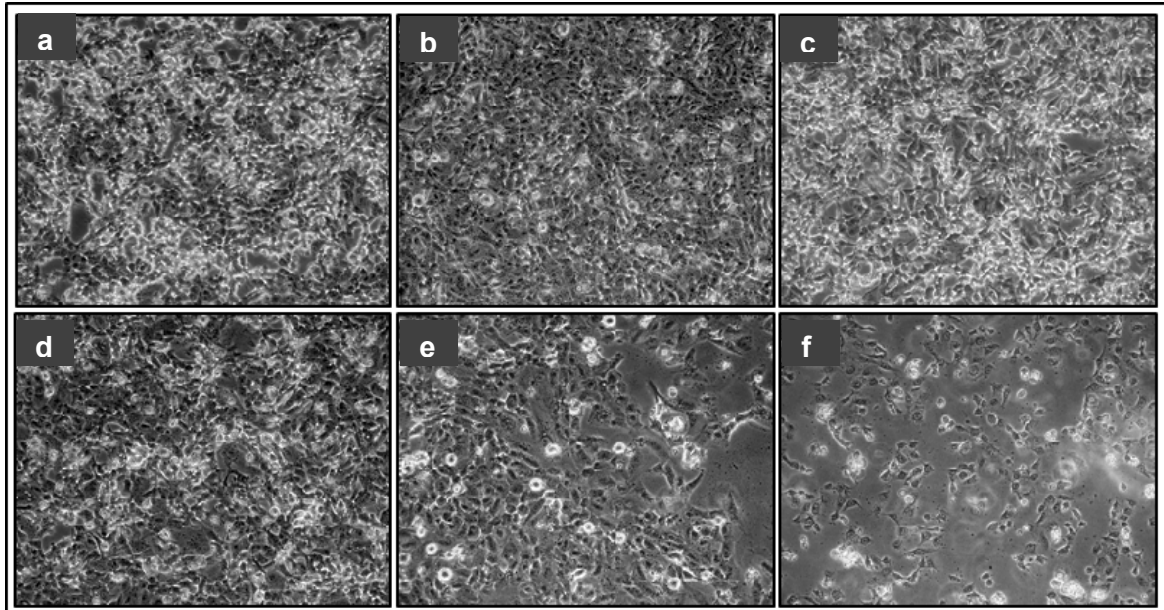
In der Negativkontrolle ohne Primärantikörper konnte jeweils keine eindeutige Fluoreszenz detektiert werden, wodurch die Spezifität der Fluoreszenz in der anderen Probe auf PPAR $\gamma$  bestätigt wurde. Die mit Aktin-Primärantikörper behandelten Proben zeigen, dass sich Aktin im Gegensatz zu PPAR $\gamma$  im Zytosol der Zellen befindet.

Es konnte somit gezeigt werden, dass PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomzelllinien nukleär exprimiert wird.

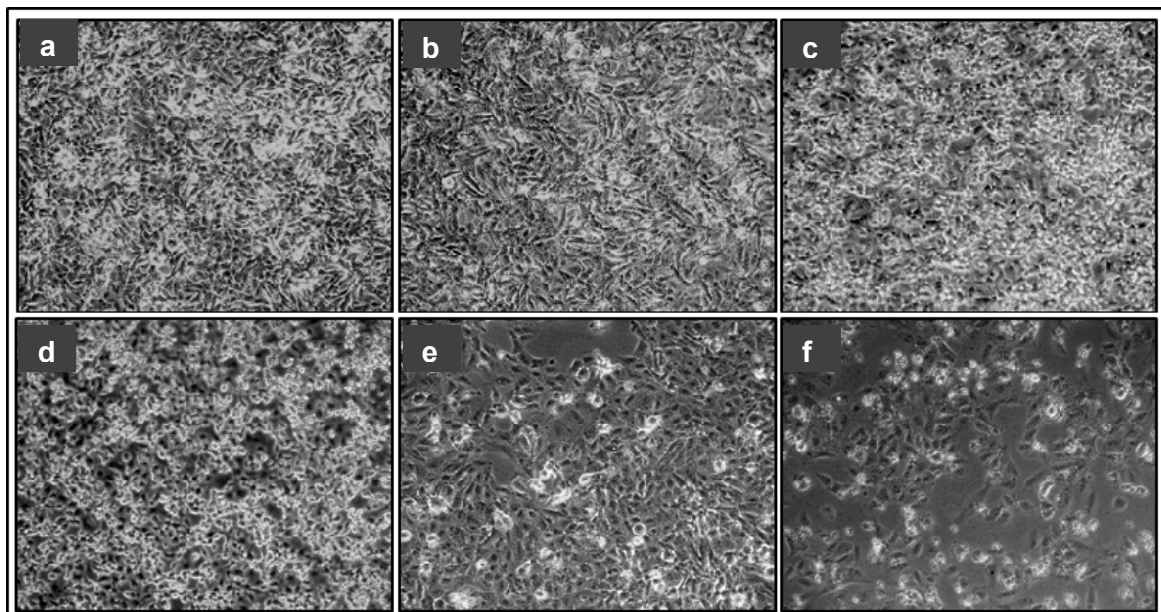
### 5.3 Stimulation von PPAR $\gamma$ mit Rosiglitazon

Um die Bedeutung von PPAR $\gamma$  für humane Meningeome weiter zu untersuchen, wurden nun die Zelllinien BenMen-1 (benigne) und IOMM-Lee (maligne) mit unterschiedlichen Konzentrationen des spezifischen PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon behandelt.

In den lichtmikroskopischen Bildern in **Abbildung 11** und **12** ist zu erkennen, dass die Anzahl der Zellen in den mit Rosiglitazon stimulierten Kulturen mit aufsteigender Konzentration deutlich abnimmt. Die Bilder in Abbildung 12a und 13a zeigen die Zelllinien BenMen-1 und IOMM-Lee in reinem Zellkulturmedium nach 48 h. Die Zellen wachsen dicht, die äußere Form der Zellen ist aufgrund des dichten Wachstums jedoch nicht immer eindeutig zu beurteilen. Die in Abbildung 12b und 13b zu sehenden, mit Ethanol versetzten Kulturen zeigen im Vergleich zu diesen Negativkontrollen keine Veränderung der Zelldichte und äußeren Form der Zellen. Im Gegensatz dazu erkennt man nach der 48-stündigen Stimulation mit Rosiglitazon eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellzahl. Speziell die Zellkulturen, die mit 30  $\mu$ M bzw. 40  $\mu$ M Rosiglitazon behandelt wurden, die in Abbildung 12e und f bzw. Abbildung 13e und f zu sehen sind, zeigen eine deutliche Reduktion der Zellzahl und im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle nur eine geringe Konfluenz. Die Morphologie der Zellen scheint jedoch nicht verändert zu sein. Zwischen den beiden Zelllinien BenMen-1 und IOMM-Lee lassen sich keine Unterschiede feststellen.

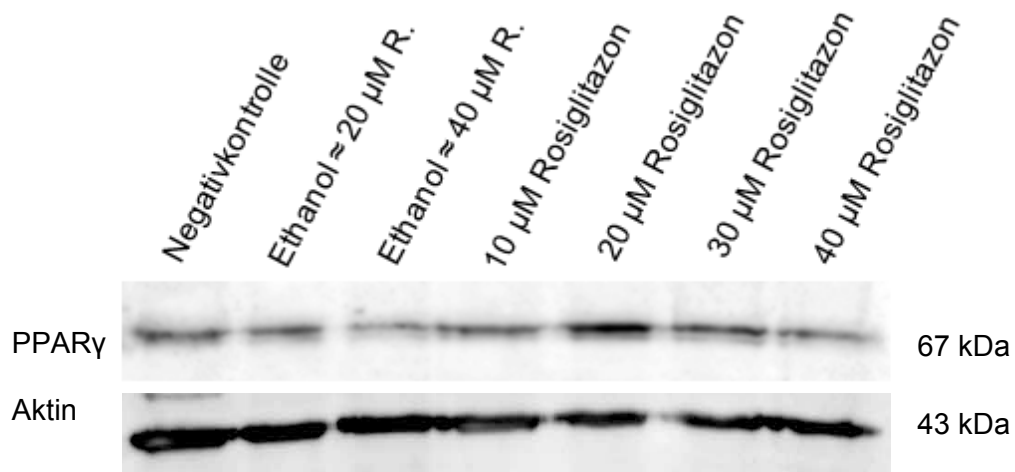


**Abbildung 11:** Lichtmikroskopische Veränderungen der Zelllinie BenMen-1 nach 48-stündiger Inkubation **a:** Kontrolle, **b:** Ethanol, **c:** 10, **d:** 20, **e:** 30 und **f:** 40 μM Rosiglitazon.

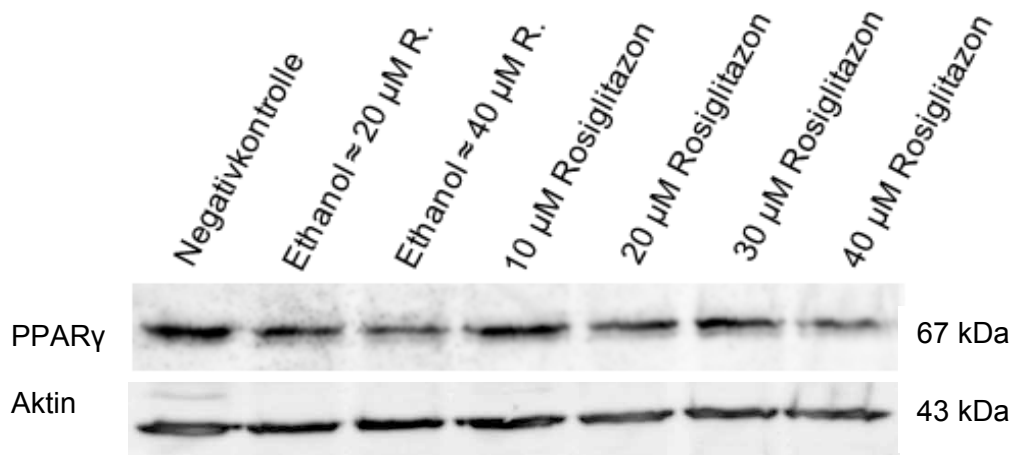


**Abbildung 12:** Lichtmikroskopische Veränderungen der Zelllinie IOMM-Lee nach 48 stündiger Inkubation **a:** Kontrolle, **b:** Ethanol, **c:** 10, **d:** 20, **e:** 30 und **f:** 40 μM Rosiglitazon.

Im Western Blot lässt sich nach der Stimulation mit Rosiglitazon ebenfalls kein eindeutiger Wirkunterschied zwischen der benignen Zelllinie BenMen-1 und der malignen Zelllinie IOMM-Lee erkennen. Bei beiden Zelllinien zeigt sich eine leichte Abnahme der PPAR $\gamma$  Konzentration nach 48-stündiger Inkubation mit Ethanol, wobei die höhere Ethanolkonzentration zu einer stärkeren Abnahme führt. Im Vergleich dazu kann man in den mit Rosiglitazon behandelten Proben beider Zelllinien höhere PPAR $\gamma$  Konzentrationen sehen. Speziell in den Proben, die mit Rosiglitazon in Konzentrationen von 10  $\mu$ M bis 30  $\mu$ M stimuliert wurden, sieht man deutliche Konzentrationszunahmen von PPAR $\gamma$ . Bei BenMen-1 zeigt sich in **Abbildung 13** ein deutlicher Anstieg zwischen 10  $\mu$ M und 20  $\mu$ M Rosiglitazon. Die Bande bei 30  $\mu$ M Rosiglitazon ist etwas schwächer als die bei 20  $\mu$ M, jedoch stärker als die bei 10  $\mu$ M. Innerhalb der Proben der Zelllinie IOMM-Lee sieht man in **Abbildung 14** die stärksten Konzentrationen von PPAR $\gamma$  bei 10  $\mu$ M und 30  $\mu$ M Rosiglitazon. Die Bande bei 20  $\mu$ M ist im Vergleich dazu etwas schwächer. In beiden Zelllinien lässt sich eine Abnahme der PPAR $\gamma$  Konzentration bei 40  $\mu$ M Rosiglitazon feststellen, wobei sich die Bande nur unwesentlich stärker darstellt als die der höher konzentrierten Ethanolkontrolle.



**Abbildung 13:** Western Blot PPAR $\gamma$  der Zelllinie BenMen-1 nach Stimulation mit Rosiglitazon für 48 h und Ethanolkontrollen.



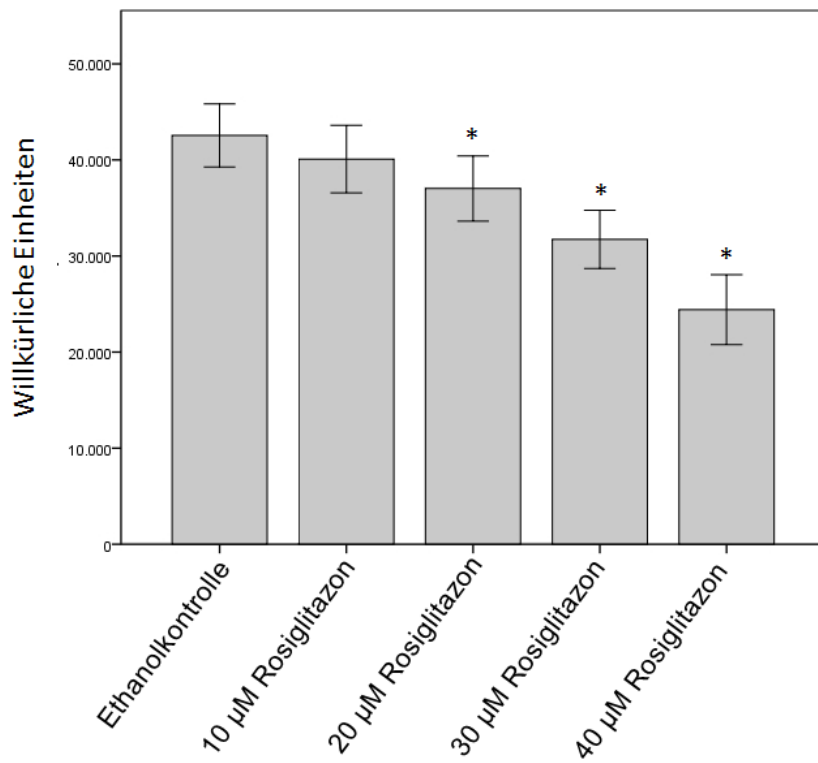
**Abbildung 14:** Western Blot PPAR $\gamma$  der Zelllinie IOMM-Lee nach Stimulation mit Rosiglitazon für 48 h und Ethanolkontrollen.

#### 5.4 Einfluss von Rosiglitazon auf die Meningeomzell-Proliferation

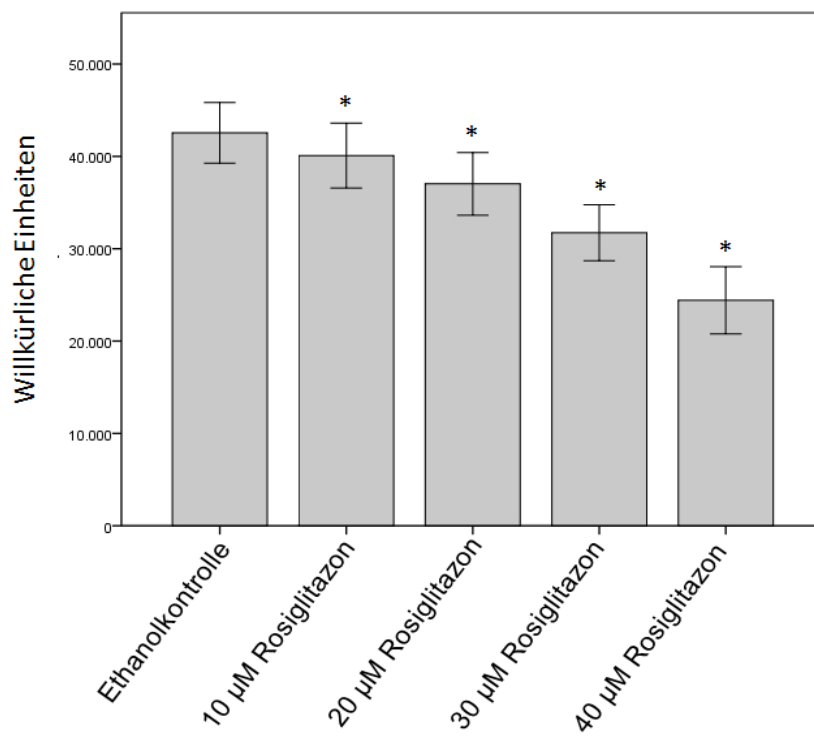
Durch die Stimulation von PPAR $\gamma$  mit Rosiglitazon ist zu beobachten, dass die Tumorzellen in ihrer Proliferation und Viabilität gehemmt werden. Dies konnte zum einen mit einem BrdU-Proliferations-Assay und zum anderen mit einem MTT-Assay gezeigt werden.

In **Abbildung 15 und 16** sind die Ergebnisse des BrdU-Proliferations-Assays zu sehen. Es lässt sich ein deutlicher antiproliferativer Effekt von Rosiglitazon feststellen, der in der benignen und in der malignen Zelllinie in gleichem Maße ausgeprägt ist.

Der Vergleich der Ethanolkontrolle mit den Proben, die 48 h mit Rosiglitazon in Konzentrationen von 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M bzw. 40  $\mu$ M behandelt worden waren, zeigt in beiden Zelllinien eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Proliferation in den Rosiglitazonproben. Die Proben der Zelllinie IOMM-Lee ließen auch bei Stimulation mit 10  $\mu$ M Rosiglitazon noch eine signifikante Abnahme ( $p < 0,05$ ) erkennen.

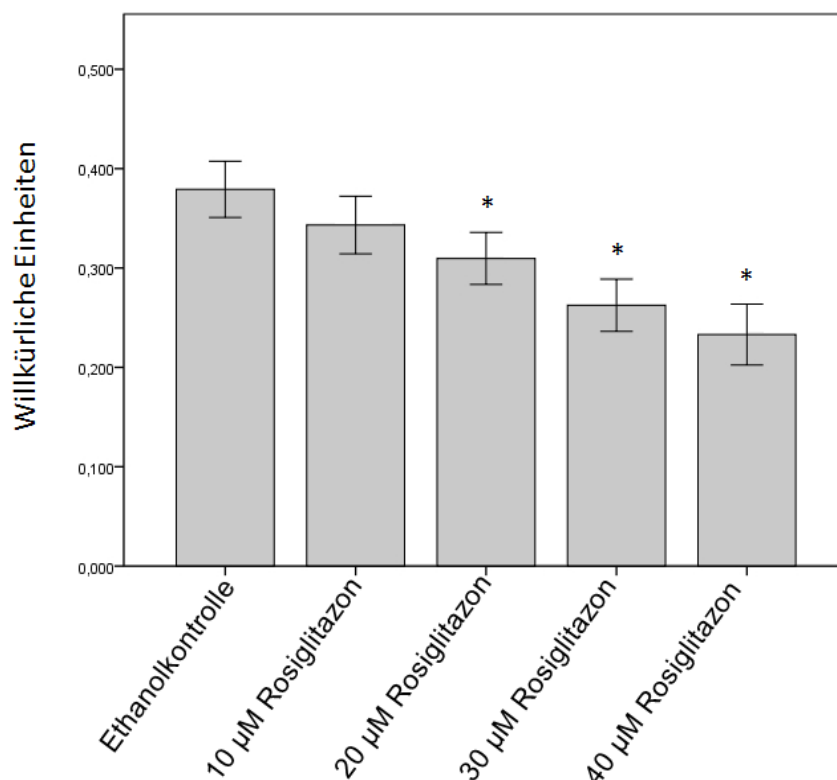


**Abbildung 15:** BrdU-Proliferations-Assay der Zelllinie BenMen-1 nach 48-stündiger Stimulation mit Rosiglitazon (\*  $p < 0,05$ ).



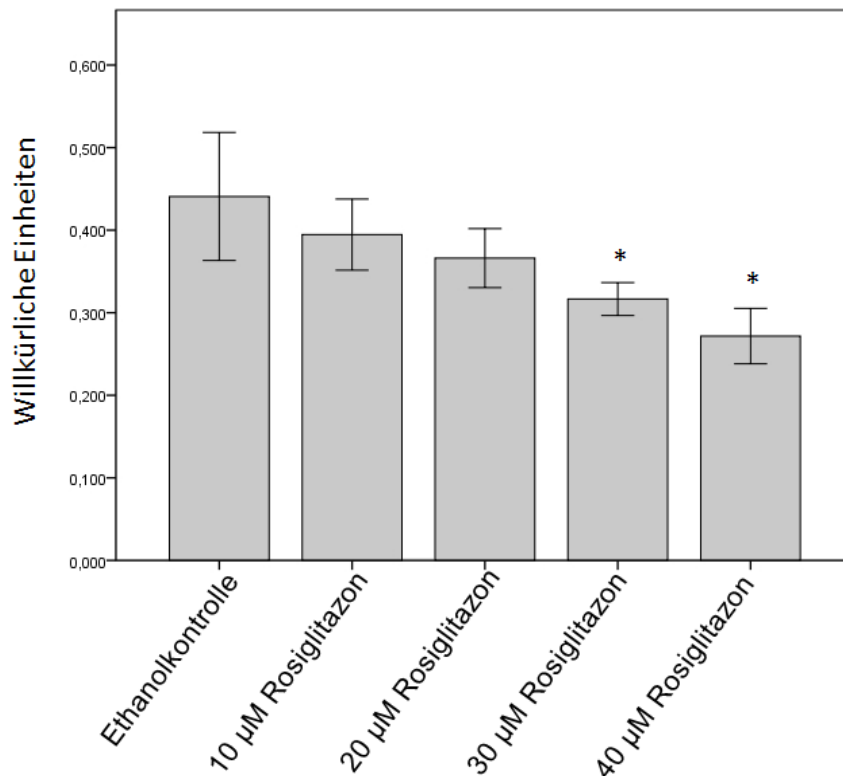
**Abbildung 16:** BrdU-Proliferations-Assay der Zelllinie IOMM-Lee nach 48-stündiger Stimulation mit Rosiglitazon.

Die in Abbildung 15 und 16 dargestellte Zellzahlabnahme wurde mit einem MTT-Viabilitätstest genauer quantifiziert. Auch hier zeigt sich ein ähnliches Bild wie das im Proliferationsassay. Wie man den **Abbildung 17 und 18** entnehmen kann, ist der Zellzahl reduzierende Effekt von Rosiglitazon nach 48-stündiger Inkubation wieder annähernd identisch in beiden Zelllinien ausgeprägt. Dass mit steigender Konzentration des Agonisten die Zellzahl abnimmt, ist bei beiden Zelllinien als eindeutige Tendenz zu erkennen. Im Vergleich zur Ethanolkontrolle sieht man bei den mit 30  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon stimulierten Proben der Zelllinie BenMen-1 eine hochsignifikante Reduktion der Zellzahl ( $p < 0,01$ ). Auch bei 20  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon ist eine signifikante Abnahme ( $p < 0,05$ ) zu sehen. In der Zelllinie IOMM-Lee stellt sich bei 40  $\mu\text{M}$  ein hochsignifikanter ( $p < 0,01$ ) und bei 30  $\mu\text{M}$  ein signifikanter Effekt ( $p < 0,05$ ) dar (durch Sternchen gekennzeichnet).



**Abbildung 17:** MTT-Assay der Zelllinie BenMen-1 nach 48-stündiger Stimulation mit Rosiglitazon (\*  $p < 0,05$ ).

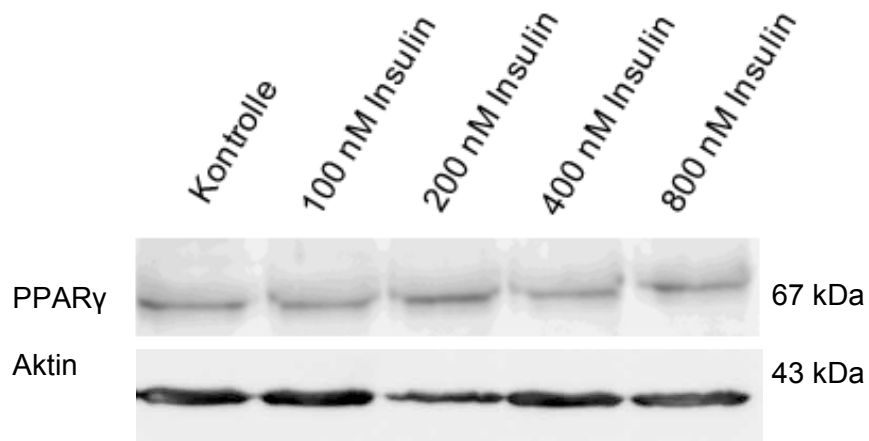




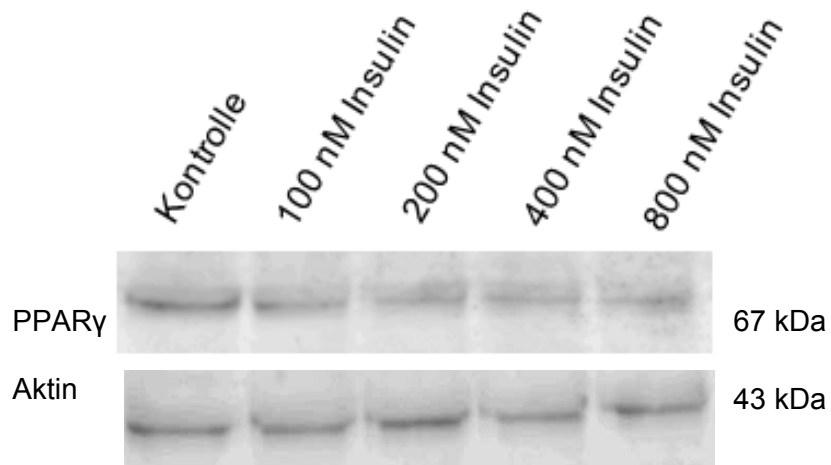
**Abbildung 18:** MTT-Assay der Zelllinie IOMM-Lee nach 48-stündiger Stimulation mit Rosiglitazon.

## 5.5 Stimulation von PPAR $\gamma$ mit Insulin

Da Insulin als starkes Mitogen auf das Wachstum von Meningeomzellen wirkt, wurden die Zelllinien mit aufsteigenden Konzentrationen Insulin behandelt, um einen möglichen Effekt auf die PPAR $\gamma$  Expression zu untersuchen. Im Lichtmikroskop konnte nach 48-stündiger Inkubation mit Insulin und vorherigem Serumentzug von 24h ein gesteigertes Wachstum in den Zellkulturschalen gesehen werden, welches in Korrelation zu der zunehmenden Insulinkonzentration stand. Die im Western Blot untersuchten Proteinlysate lassen jedoch keine Unterschiede in der Bandenstärke von PPAR $\gamma$  erkennen. Keine der Insulinproben in **Abbildung 19 und 20** zeigt eine deutliche Veränderung in der Bandenstärke von PPAR $\gamma$  im Vergleich zur Kontrolle. Dieses Ergebnis stellt sich in beiden Zelllinien, unabhängig von ihrer Malignität, in gleicher Form dar. Somit lässt sich sagen, dass durch Stimulation mit Insulin zwar das Wachstum von Meningeomzellen angeregt wird, die PPAR $\gamma$ -Proteinexpression jedoch nicht wahrnehmbar beeinflusst zu werden scheint.



**Abbildung 19:** Western Blot PPAR $\gamma$  der Zelllinie BenMen-1 nach Stimulation mit Insulin



**Abbildung 20:** Western Blot PPAR $\gamma$  der Zelllinie IOMM-Lee nach Stimulation mit Insulin

## 6. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle von PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen verschiedener WHO-Grade näher zu charakterisieren. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf der Betrachtung des Expressionsgrades von PPAR $\gamma$  auf mRNA- und Proteinebene. Des Weiteren sollte der Einfluss einer Stimulation von PPAR $\gamma$  auf das Überleben von benignen und malignen Meningeomzellen untersucht werden.

### 6.1 Diskussion der Ergebnisse

#### 6.1.1 Expression von PPAR $\gamma$

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass humane Meningeome PPAR $\gamma$  exprimieren. Angesichts der in der Literatur beschriebenen antiproliferativen Effekte, welche durch PPAR $\gamma$  vermittelt werden sollen, könnte man nun einen Zusammenhang zwischen der quantitativen Expression von PPAR $\gamma$  und dem WHO-Grad der Meningeome vermuten. Entsprechend dieser Überlegung müssten benigne Meningeome mehr und malignere Meningeome deutlich weniger PPAR $\gamma$  exprimieren. Es konnte in der hier vorliegenden Arbeit jedoch kein derartiger Zusammenhang festgestellt werden. Entgegen unserer ursprünglichen Annahme zeigten die maligneren Meningeome (WHO-Grad II/III) keine niedrigeren Expressionslevel als die benignen WHO-Grad-I-Meningeome. Diese Ergebnisse wurden auf RNA- und Proteinebene sowohl in humanen Meningeomgeweben als auch in humanen Meningeomzelllinien dargestellt. Die Aggressivität von humanen Meningeomen scheint somit nicht primär von der quantitativen Expression von PPAR $\gamma$  abhängig zu sein. Wie zum Teil widersprüchlich sich die Expression dieses Proteins in verschiedenen Tumoren bzw. die Tumorfrequenz in verschiedenen Tieren mit PPAR $\gamma$ -Verlustmutationen verhält, wurde bereits von mehreren Gruppen erforscht. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die heterozygot für den Genverlust von PPAR $\gamma$  waren, vermehrt an Colon-, Ovar- und Brustkrebs litten (Girnun et al. 2002). Dies würde unsere ursprüngliche These stützen, nach der eine geringere PPAR $\gamma$ -Expression mit mehr malignen Erkrankungen einhergeht. Allerdings konnte bei Mäusen, die homozygot für den Genverlust von PPAR $\gamma$  in ihren Brustepithelien waren, kein gehäuftes Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen werden (Cui et al. 2002 ). Dies wiederum deckt sich mit den experimentellen

Ergebnissen dieser Arbeit, nach denen die rein quantitative Expression von PPAR $\gamma$  keinen Einfluss auf die Anzahl von Tumorerkrankungen bzw. deren Malignität zu haben scheint.

In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, welchen Einfluss PPAR $\gamma$  in Bezug auf das Überleben und die Proliferation von Meningeomen tatsächlich hat und wie essentiell dieser ist. Zu vermuten wäre, dass die nach Behandlung mit Glitazonen beobachteten antiproliferativen Effekte auf Tumorzellen nicht ausschließlich auf PPAR $\gamma$ -vermittelten Mechanismen beruhen, sondern auch eine ganze Reihe PPAR $\gamma$ -unabhängiger Mechanismen von Bedeutung sind.

#### 6.1.2 Die Rolle von IGF in humanen Meningeomen

Gesichert ist hingegen, wie Insulin und verschiedene IGF (*Insulin-like growth factor*) - Rezeptoren Einfluss auf das Wachstum von humanen Meningeomen nehmen. IGF-I und IGF-II haben zueinander und zu Proinsulin enge strukturelle Ähnlichkeit und besitzen daher die Fähigkeit mit den Rezeptoren der jeweils anderen Faktoren zu interagieren. IGF-I und -II konnten in fetalem Hirngewebe nachgewiesen werden, scheinen in adultem Hirngewebe jedoch nicht exprimiert zu werden. Lediglich die Epithelzellen der Choroidea synthetisieren auch im Alter IGF-II sowie den Rezeptor für IGF-I. Da Meningeome aus eben diesen Epithelzellen hervorgehen, wird ein Zusammenhang zwischen IGF-Expression und dem Meningeomwachstum angenommen, zumal beispielsweise in Gliomen keine derartige Expression gefunden werden konnte (Stylianopoulou et al. 1988, Lichtor et al. 1991). Nicht völlig verstanden ist jedoch, warum nicht alle Zellen innerhalb eines Meningeoms IGF exprimieren, sondern lediglich eine Subgruppe dieser Zellen. Es wird davon ausgegangen, dass Meningeome nicht aus einem homogenen Zelltypus bestehen und ein großer Teil dieser Zellen nicht neoplastisch ist. Vielmehr scheinen die von einer neoplastischen Zellgruppe synthetisierten Wachstumsfaktoren über auto- und parakrine Regulationsmechanismen Einfluss auf Formation und Wachstum des gesamten Meningeomgewebes zu nehmen (Lichtor et al. 1993). Bei der hier durchgeführten Stimulation von Meningeomzellen mit aufsteigenden Insulinkonzentrationen konnte dieser wachstumsfördernde Effekt im lichtmikroskopischen Vergleich eindeutig nachgewiesen werden, wobei allerdings

immer einheitliche Zellpopulationen der Linien IOMM-Lee und BenMen-1 verwendet wurden. Ein sichtbarer Unterschied zwischen maligner und benigner Zellreihe war nicht zu verzeichnen.

In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das IGF-System in einer Vielzahl von humanen Malignomen dysreguliert bzw. überaktiviert ist. So konnten eine erhöhte Konzentration von IGF-I im Plasma sowie hohe Plasmainsulinspiegel mit einem deutlich erhöhten Risiko für verschiedene Krebsleiden in Zusammenhang gebracht werden (Vigneri et al. 2006, Strickler et al. 2001, Bruce et al. 2000). Hyperinsulinämie und Insulinresistenz scheinen dabei die entscheidenden Bindeglieder zwischen Übergewicht, Diabetes mellitus Typ II und gesteigerter Krebshäufigkeit zu sein und gelten außerdem als Indiz für eine schlechtere klinische Prognose. Die resultierende IGF-System Dysregulation geht dabei nicht auf die Mutation der Insulin- oder IGF-Rezeptoren zurück, sondern beruht vielmehr auf einer Überexpression von Liganden und Rezeptoren, die wiederum eine Tumorprogression fördern. Im Mittelpunkt stehen dabei zwei intrazelluläre Signalwege, der PI3K / mTOR (*Phosphatidylinositol-3 Kinase / mammalian target of rapamycin*) und der MAPK (*Mitogen aktivierte Protein Kinase*) Signalweg.

#### 6.1.2.1 PI3K/mTOR Signalweg

Am Beginn des PI3K Signalweges steht die Aktivierung der Lipidkinase PI3K durch Bindung einer spezifischen p85 Untereinheit an die katalytische p110 Untereinheit der PI3K. Aktiviertes p110 kann dann durch Phosphorylierung die Bildung von PIP3 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat*) aus PIP2 (*Phosphatidylinositol-3,4,5-bisphosphat*) katalysieren. PIP3 trägt durch Phosphorylierung wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase Akt bei. Diese ist essentiell für den Glukosemetabolismus sowie die Regulation von Zellgröße, Proliferation und Überleben. Weiterhin reguliert Akt via mRNA-Translation den raptor-mTOR Signalweg, welcher ebenfalls eine zentrale Rolle für Zellwachstum und Metabolismus spielt (Sarbasov et al. 2005).

Um den raptor-mTOR-Komplex zu aktivieren, muss eine Bindung mit dem GTP-Bindeprotein Rheb (*Ras homologue enriched in brain*) erfolgen, welche wiederum durch den heterodimerischen Komplex aus TSC1 und TSC2 (*tuberous sclerosis*

*complex*) ermöglicht wird. Akt phosphoryliert und inaktiviert dabei TSC2 und sorgt somit für eine gesteigerte Menge des aktiven GTP-Rheb, das dann den raptor-mTOR-Komplex aktiviert. Dem raptor-mTOR-Komplex nachgeschaltet finden sich zwei Signalwege. Zum einen p70S6K, eine Serin/Threonin-Proteinkinase, die die Synthese von diversen Faktoren reguliert, welche in die Proteinsynthese verwickelt sind. Zum anderen eIF4E-BP1 (*eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein1*), welches nach Phosphorylierung durch raptor-mTOR die cap-abhängige mRNA Translation ermöglicht. Dieser gesamte Signalweg, in den PI3K und Akt involviert sind, wird über die Lipidphosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) negativ reguliert. PTEN ist in der Lage PIP3 zu dephosphorylieren und somit den gesamten nachgeschalteten Signalweg zu inhibieren. Die Aktivität von PTEN ist bei Tumorerkrankungen häufig durch Mutation reduziert, wodurch es zu einer Erhöhung des intrazellulären PIP3-Levels und nachfolgend zu einer übermäßigen Aktivierung von Akt kommt, was wiederum zu einer Verstärkung der von Akt regulierten zellulären Prozesse führt. Weiterhin scheinen PTEN Mutationen zu einer fehlerhaften Signalweiterleitung im IGF-System beizutragen (O'Connor et al. 2000). In humanen Meningeomen scheinen derartige Mutationen jedoch selten zu sein. Allerdings gibt es Hinweise auf Beeinflussung des PI3K/Akt Signalwegs durch Stimulation humaner Meningeome mit verschiedenen Wachstumsfaktoren. So soll nach PDGF (*Platelet derived growth factor*)-Stimulation von WHO-Grad I Meningeomen der PI3K/Akt Signalweg eine entscheidende Rolle für die Proliferation dieser Tumoren spielen (Johnson et al. 2002). Nach Stimulation mit EGF (*Epidermal growth factor*) konnte eine Akkumulation von Phosphatidylinositol in Meningeomzellen gezeigt werden, was wiederum eine vermehrte Aktivierung von Akt bewirkt (Todo und Fahlbusch 1994). Mawrin et al. konnten schließlich nachweisen, dass in anaplastischen und malignen Meningeomen phosphoryliertes und somit aktiviertes Akt in hohen Konzentrationen vorkommt. Auch konnte durch Behandlung mit dem Akt-Inhibitor Wortmannin eine Reduktion von Proliferation und Überleben in malignen Meningeomzellen erzielt werden. Diese Ergebnisse lassen es insgesamt wahrscheinlich erscheinen, dass eine Aktivierung des PI3K/Akt Signalwegs substantiell zur gesteigerten Aggressivität von Meningeomen beiträgt (Mawrin et al. 2005).

#### 6.1.2.2 MAP-Kinase Signalweg

Im zweiten wichtigen intrazellulären Signalweg des IGF-Systems, dem MAP-Kinase Signalweg, steht das GTP-Bindeprotein Ras (*Rat sarcoma*) relativ am Anfang einer Phosphorylierungskaskade. Sobald Ras nach GTP-Bindung aktiviert wurde, kann es die Serin/Threonin-Kinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*) mittels Membranrekrutierung aktivieren. Raf kann wiederum MEK1/2 (*MAPK-Kinase*) phosphorylieren, welche in aktivierter Form letztlich, ebenfalls durch Phosphorylierung, die Aktivierung von ERK1/2 (*Extracellular-signal regulated Kinase*) ermöglichen. ERK1/2 stellen eine bestimmte Subgruppe in der Familie der MAP-Kinasen dar, deren Bezeichnung früher synonym zu MAPK gebräuchlich war. Aktives ERK transloziert schließlich in den Nukleus, wo es mittels Phosphorylierung verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren kann. Die genregulatorischen Veränderungen betreffen vorwiegend zellzyklische Aspekte wie Proliferation und Apoptose, Zellmigration und –invasion. Weiterhin können eine Reihe von zytoplasmatischen Substraten, wie beispielsweise p90 RSKs (*ribosomal S6 Kinasen*), durch ERK phosphoryliert werden. Diese können proapoptotische Proteine inaktivieren und über positive Regulation der mRNA Translation ebenfalls in Zellwachstum und Überleben eingreifen (Roux und Blenis 2004). Des Weiteren existieren direkte Interaktionen mit dem PI3K Signalweg, beispielsweise über Aktivierung der PI3-Kinase durch Ras sowie negative Regulierung von Raf durch Akt (Sebolt-Leopold und Herrera 2004).

Durch Johnson et al. konnte eine Verbindung zwischen der PDGF-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase und der Wachstumsregulation in benignen Meningeomen hergestellt werden. Weitere Studien zeigen eindeutige antiproliferative sowie proapoptotische Effekte des MAPK-Inhibitors PD98059 auf maligne Meningeomzellen. Auch scheint es eine Korrelation zwischen der Rezidivwahrscheinlichkeit von Meningeomen und dem Vorkommen von phosphoryliertem Raf und Erk im Zellkern zu geben (Mawrin et al. 2005). Diese Daten implizieren, dass eine Aktivierung des MAPK Signalwegs in malignen Meningeomen wachstumsfördernde und antiapoptotische Effekte vermitteln.

### 6.1.3 Interaktionen zwischen IGF und PPAR $\gamma$

Das IGF-System steht über verschiedene Wechselwirkungen in Beziehung mit PPAR $\gamma$  (siehe Abb. 21). Beispielsweise gibt es eine ganze Reihe von Interaktionspunkten zwischen dem MAPK-Signalweg und PPAR $\gamma$ . Durch MAPK-abhängige Phosphorylierung eines Serinrestes wird so zum Beispiel die Fähigkeit von PPAR $\gamma$  beeinflusst, mit RXR ein Heterodimer zu bilden, PPRE (*Peroxisome Proliferator Response Element*) zu binden und folglich die Transkription diverser Gene zu induzieren (Adams et al. 1997). Die genomische Aktivität von PPAR $\gamma$  wird also durch MAPK-abhängige Phosphorylierung supprimiert und somit die PPAR $\gamma$ -abhängige Gentranskription inaktiviert, wodurch die antiproliferative, antiinflammatorische und prodifferenzielle Wirkung von PPAR $\gamma$  unterdrückt wird. Eine rein quantitative Beeinflussung der PPAR $\gamma$ -Expression in humanen Meningeomzelllinien durch Stimulation mit Insulin konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch ausgeschlossen werden. Es ist also nicht davon auszugehen, dass Insulin und IGF ihre positive Wirkung auf Proliferation und Wachstum von humanen Meningeomen durch tatsächliche quantitative Abnahme der PPAR $\gamma$ -Expression bewirken. Vielmehr scheinen Mechanismen, wie beispielsweise der oben beschriebene, zu einer Hemmung der antiproliferativen Wirkung von PPAR $\gamma$  beizutragen. Diese könnten zumindest in Teilen für die wachstumsfördernde Wirkung von IGF auf humane Meningeome verantwortlich sein.

Weiterhin wurde eine direkte Interaktion zwischen MEK1 und PPAR $\gamma$  nachgewiesen, die zum Export des Rezeptors vom Zellkern ins Zytoplasma führt. Diese Änderung der subzellulären Lokalisation scheint das Gleichgewicht zwischen der tumorsuppressiven und der wachstumsfördernden Aktivität von PPAR $\gamma$  zu beeinflussen. In nicht neoplastischen Zellen ist PPAR $\gamma$  überwiegend im Zellkern lokalisiert, in Tumorgewebe scheint es jedoch gehäuft im Zytoplasma vorzuliegen, was mit erhöhter Tumoraggressivität und einer schlechteren klinischen Prognose assoziiert zu sein scheint (Motomura et al. 2000). In den in dieser Arbeit durchgeführten Immunfluoreszenzuntersuchungen konnte jedoch kein eindeutiger Hinweis auf eine derartige Lokalisationsänderung gefunden werden. Zwar erschien das Zytoplasma beider Meningeomzelllinien nicht völlig signalfrei, der Zellkern zeigte jedoch ein deutlich stärkeres Signalverhalten. Dabei ließ sich kein eindeutiger Unterschied zwischen der malignen und der benignen Zelllinie identifizieren, womit

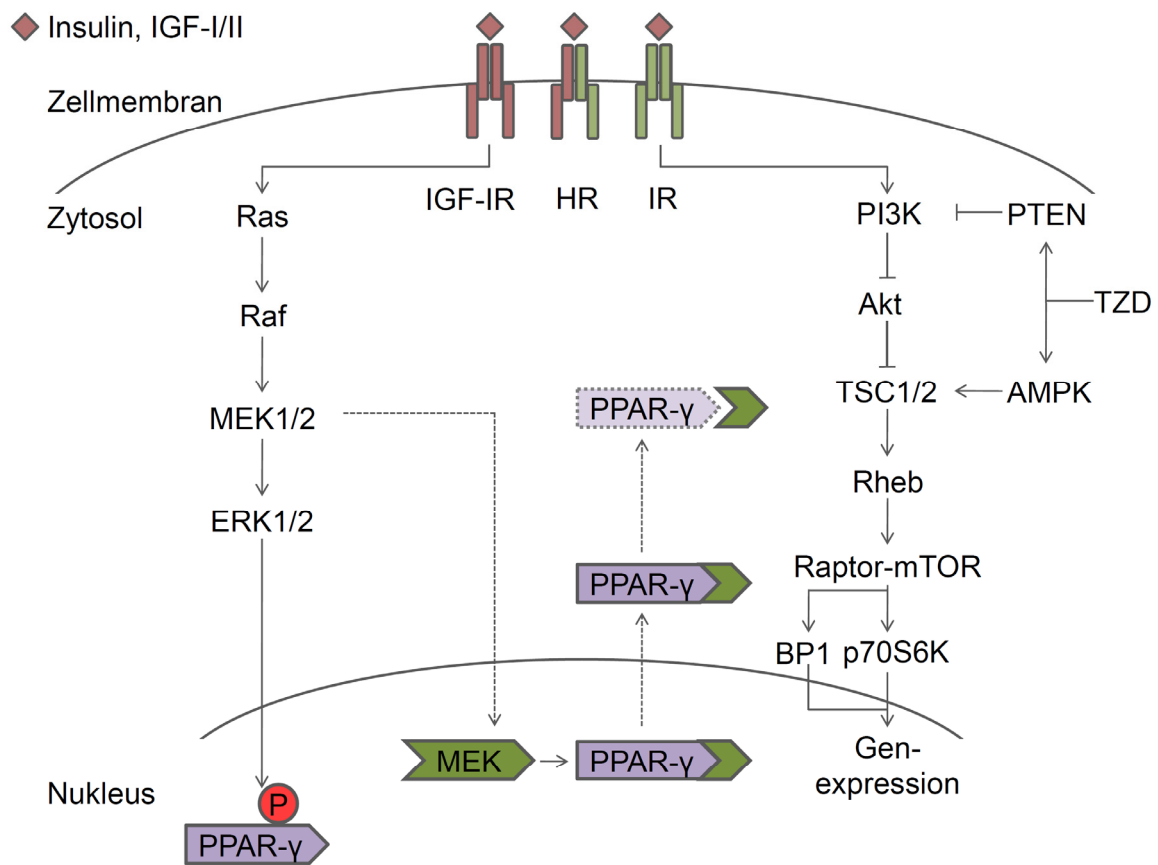


davon ausgegangen werden kann, dass die gesteigerte Aggressivität der malignen Meningeomzellen nicht auf einem derartigen Shuttlemechanismus beruht. Ebenfalls gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, dass in dieser Arbeit kaum PPAR $\gamma$ -Protein mittels gewöhnlicher Zellaufschlüsse zu isolieren war und nur durch spezielle Auftrennung der nukleären Fraktion Protein in verwertbarer Menge gewonnen werden konnte. Die Summe dieser Beobachtungen lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass PPAR $\gamma$  in Meningeomen eher im Zellkern lokalisiert ist und der beschriebene Mechanismus insgesamt zumindest in den hier untersuchten Meningeomzelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 keine entscheidende Rolle spielt.

Weiterhin konnte in verschiedenen gewebe- und zellspezifischen Kontexten eine zeit- und dosisabhängige Dephosphorylierung von ERK1/2 sowie eine verminderte Expression von MEK1/2 durch PPAR $\gamma$ -Agonisten nachgewiesen werden. Über diese Mechanismen werden wiederum Zellwachstum gehemmt und Apoptose eingeleitet (Hashimoto et al. 2004). Glitazone scheinen somit eine sinnvolle therapeutische Herangehensweise in Tumoren darzustellen, in denen der IGF-I und/oder der MAPK Signalweg überaktiviert sind. Da diese Überexpression wie oben beschrieben in Meningeomen recht häufig beobachtet wird, ist dieser Ansatz durchaus vielversprechend.

Es scheinen jedoch auch über den PI3K Signalweg Verbindungen zwischen dem IGF-System und PPAR $\gamma$  zu bestehen. So kann die Phosphorylierung und Aktivierung von Akt, welche die IGF-I stimulierte Proliferation reguliert, durch PPAR $\gamma$ -Agonisten beeinflusst werden (Giulia et al. 2008). Ein möglicher Mechanismus, der dem zu Grunde liegt, ist eine Steigerung der Expression von PTEN. Es existieren in diesem Zusammenhang zwei Hypothesen, um diese Interaktion zwischen PPAR $\gamma$  und PTEN zu erklären. Zum einen könnte PPAR $\gamma$  direkt bzw. über Beeinflussung sekundärer, bislang unbekannter Faktoren die Transkription von PTEN regulieren. Zum anderen wäre es denkbar, dass PPAR $\gamma$ -Agonisten den Abbau von PTEN einschränken und somit eine sekundäre Überexpression induzieren (Vazquez et al. 2000, Waite und Eng 2003). Aber auch die mTOR/p70S6K Kaskade stellt eine Verbindung zwischen PPAR $\gamma$  und PI3K dar. Glitazone sollen mittels PPAR $\gamma$ -abhängigen und PPAR $\gamma$ -unabhängigen Mechanismen zu einer Hochregulation von AMPK (*AMP-aktivierte Proteinkinase*) führen, wodurch es wiederum zu einer Suppression der IGF-I-

induzierten Zellproliferation durch Inhibition der mTOR-Aktivität und Phosphorylierung von p70S6K komme (He et al. 2006).



**Abbildung 21:** Die beiden Signalwege des IGF-Systems

Links im Bild ist der MAPK- und rechts im Bild der PI3K/raptor-mTOR-Signalweg dargestellt. Modifiziert nach Belfiore et al. 2009

Ebenfalls erwiesen ist, dass PPAR $\gamma$ -Agonisten durch positive Beeinflussung der Insulinresistenz in Patienten mit Hyperinsulinämie bei Diabetes mellitus Typ II zu einer Reduktion der IGF-I-Spiegel führen. Insgesamt unterstreichen diese Ergebnisse erneut die antiproliferativen Eigenschaften von Glitazonen. Auch in dieser Arbeit konnte diese Eigenschaft, im Speziellen die von Rosiglitazon, mittels MTT- und Proliferations-Assay nachgewiesen werden. So war in beiden untersuchten Meningeomzelllinien eine dosisabhängige Reduktion der Viabilität und Proliferation nach 48-stündiger Stimulation mit Rosiglitazon zu erkennen. Dass Glitazone diese Wirkung auch *in vivo* erzielen können, konnte in einer retrospektiven Studie an Diabetespatienten unter Glitazon-Therapie gezeigt werden. In dieser Studie wurde

eine 33%ige Reduktion des Risikos für Lungen-Karzinome in der Patientengruppe beobachtet, die regelmäßig Glitazone einnahmen, im Vergleich zu Patienten, die mit anderen oralen Antidiabetika oder Insulin behandelt wurden (Govindarajan et al. 2007). Selbstverständlich sind weitere randomisierte und placebokontrollierte Studien notwendig, um einen protektiven Effekt von Glitazonen bezüglich Tumorerkrankungen zu belegen, jedoch scheinen die genannten Ergebnisse vielversprechend.

#### 6.1.4 Möglichkeit PPAR $\gamma$ -unabhängiger Effekte

In den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blots, in denen Protein aus den mit Rosiglitazon stimulierten Zelllinien IOMM-Lee und BenMen-1 aufgetragen wurde, hatte sich zwar eine Konzentrationszunahme von PPAR $\gamma$  in den mit 10, 20 und 30  $\mu$ M Rosiglitazon stimulierten Proben gegenüber den Ethanolkontrollen gezeigt, jedoch konnte in der mit 40  $\mu$ M stimulierten Probe ein Rückgang verzeichnet werden. Man kann nun spekulieren, ob die im Western Blot beobachtete Konzentrationsabnahme von PPAR $\gamma$  bei 40  $\mu$ M Rosiglitazon dadurch zu begründen ist, dass aufgrund der apoptoseinduzierenden Wirkung bereits in so vielen Zellen der Zelltod eingeleitet wurde, dass nicht mehr ausreichend repräsentatives vitales Material zur effektiven Proteinisolation zur Verfügung stand. Diese Vermutung wird in gewissem Maße von den lichtmikroskopischen Bildern gestützt, welche ein vergleichsweise spärliches Vorkommen adhärent wachsender Zellen in den mit 40  $\mu$ M Rosiglitazon behandelten Proben zeigen.

Andererseits könnte angenommen werden, dass auch in den untersuchten Meningeomzelllinien PPAR $\gamma$ -unabhängige Wirkmechanismen der Glitazone zur Geltung gekommen sind. Durch diese könnte die im MTT- und Proliferationsassay nachgewiesene, deutliche Reduktion der Viabilität bei den mit 40  $\mu$ M Rosiglitazon stimulierten Proben erklärt werden. Wenn hierbei PPAR $\gamma$ -unabhängige Wirkmechanismen von Bedeutung wären, könnten hohe Dosen Rosiglitazon, trotz quantitativ verringerter Expression von PPAR $\gamma$ , eine Reduktion der Viabilität bewirken. Dies würde zum anderen den im Western Blot nachgewiesenen, auch bei geringeren Dosierungen insgesamt nur relativ schwachen Anstieg der PPAR $\gamma$ -Expression im Vergleich zu der recht deutlichen dosisabhängigen Reduktion der

Viabilität und Proliferation erklären. Diese Beobachtung wird von anderen Studien gestützt, die keine Korrelation zwischen der Sensitivität von Tumorzellen auf die durch Glitazone induzierte Proliferationshemmung und der quantitativen PPAR $\gamma$ -Expression gefunden haben. Vielmehr scheint es deutliche Unterschiede in den Konzentrationen von PPAR $\gamma$  zu geben, die für antiproliferative Effekte einerseits und Erhöhung der Insulinsensitivität andererseits notwendig sind (Day 1999, Emery et al. 2006).

Welche Angriffspunkte für diese PPAR $\gamma$ -unabhängigen Wirkmechanismen eine Rolle spielen, wurde in zahlreichen Studien untersucht. Zunächst wurden dazu Substanzen entwickelt, die strukturell ähnlich zu einzelnen Glitazonen sind, jedoch keine Aktivität am PPAR $\gamma$ -Rezeptor ausüben. Andererseits wurden in verschiedenen Studien zusätzlich zu den herkömmlichen Glitazonen direkte PPAR $\gamma$ -Antagonisten eingesetzt. In beiden Versuchsansätzen konnten antiproliferative und proapoptotische Wirkungen auf Tumorzellen nachgewiesen werden.

Viele dieser Mechanismen scheinen jedoch zelltypspezifisch zu sein und können aufgrund von Unterschieden der intrazellulären Signalwege nicht in jedem Fall auf andere Gewebe übertragen werden. Einer dieser Angriffspunkte könnte AMPK (AMP-aktivierte Proteinkinase) sein. AMPK, ein dem mTOR Signalweg vorgeschaltetes Enzym, wird durch Rosiglitazon aktiviert, durch gleichzeitige Gabe eines PPAR $\gamma$ -Antagonisten jedoch nicht blockiert. Rosiglitazon scheint AMPK also PPAR $\gamma$ -unabhängig zu aktivieren und somit mTOR zu inhibieren (Han und Roman 2006). Bestimmte Glitazone scheinen weiterhin über Hemmung von Bcl-xL/Bcl-2 (B-cell Lymphoma) PPAR $\gamma$ -unabhängige antiproliferative Effekte auszulösen. Die Bcl-2-Familie besteht zum einen aus antiapoptotischen Vertretern wie Bcl-2 und Bcl-xL, und zum anderen aus proapoptotischen wie Bax. Liegen diese gegensätzlich wirkenden Proteine nicht im Gleichgewicht vor und kommt es beispielsweise zur Überaktivierung von Bax, folgen die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium, die Aktivierung von Caspasen und letztlich wird die Apoptose der Zelle induziert. Bei einem Überwiegen von Bcl-2 werden diese Vorgänge blockiert und die Apoptose der Zelle verhindert (Chao und Korsmeyer 1998). Glitazone können außerdem Bcl-2 inhibieren und somit proapoptotisch wirken. Eine Überexpression von Bcl-2 scheint die Tumorzellen jedoch vor der durch Glitazone induzierten Apoptose zu schützen (Wei et al. 2009).

Ein weiterer PPAR $\gamma$ -unabhängiger Mechanismus über den Glitazone proapoptotisch wirken könnte der Abbau von spezifischen, für die Zellteilung essentiellen, Regulatorproteinen im Proteasom sein. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Cyclin D1 und FLIP (*FADD-like IL1 converting enzyme inhibitory protein*). Die Aktivierung von Cyclin D1 führt zu verstärkter Proliferation von Tumorzellen. FLIP hemmt die Caspase 8 und inhibiert so die durch TNF (*Tumor necrosis factor*) induzierte Apoptose. Indem Glitazone den proteasomalen Abbau dieser Proteine fördern, ermöglichen sie somit indirekt die Apoptose von Tumorzellen (Wei et al. 2009, Weng et al. 2006).

#### 6.1.5 Kombinierte Therapieansätze

Da Glitazone ihre antiproliferativen und proapoptotischen Effekte hauptsächlich über Beeinflussung der oben beschriebenen MAPK und PI3K Signalwege vermitteln, wäre eine synergistische Behandlung durch Medikamente mit ähnlichem Wirkmechanismus zu überdenken. Durch Einsatz von Kombinationstherapien ließen sich eventuell Antitumor-Effekte verbessern und Nebenwirkungen durch geringere Konzentration der Einzelwirkstoffe verringern.

Beispielsweise wurden gezielt Versuche mit Statinen in Kombination mit Glitazonen durchgeführt. Statine sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die über Hemmung der Cholesterinsynthese in den Lipidstoffwechsel der Zellen eingreifen. Dabei kommt es durch verminderte Produktion bestimmter Cholesterinsynthese-Metabolite unter anderem zu einer reduzierten posttranslationalen Isoprenylierung von Ras. Verminderte Aktivierung von Ras führt letztlich über verringerte MAPK Aktivität zu antiproliferativen und proapoptotischen Effekten in der Tumorzelle. Es konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Statin und Pioglitazon, im Vergleich zu Einzelapplikation der Wirkstoffe, mit einer höheren proapoptotischen Wirksamkeit einhergeht (Gehring et al. 2011). Auch andere Einflussmöglichkeiten auf den Fettstoffwechsel von Meningeomzellen in Hinblick auf antitumorigene Effekte sind in Zellstudien untersucht worden. FAS (*Fettsäuresynthase*), ein multifunktionelles Enzym, welches den Aufbau von Fettsäuren katalysiert und somit essentiell für die Speicherung von Energie in Zellen ist, stellt eine dieser Möglichkeiten dar. In Tumorzellen ist FAS häufig überexprimiert, wodurch diese Zellen zur gesteigerten

Proliferation befähigt werden. Die Inhibition von FAS durch Cerulenin scheint dabei speziell in aggressiven Meningeomen eine attraktive Therapieoption darzustellen. Es wurde auch gezeigt, dass die FAS-Regulation in Meningeomen bevorzugt über den PI3K Signalweg vermittelt wird (Haase et al. 2010).

In Colonepithelien konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass PGE2 (*Prostaglandin E2*), vermittelt durch den MAPK Signalweg, Zellwachstum und Progression zu maligneren Tumorvarianten fördert. In Meningeomen wiederum wurden erhöhte Prostaglandinlevel gefunden. Es wäre also anzunehmen, dass Prostaglandine auch in der Meningeomzellproliferation zusätzliche Mediatoren darstellen könnten (Johnson und Toms 2005). Über PGE2-Inhibitoren könnte dann, beispielsweise in Kombination mit Glitazonen, eine weitere Beeinflussung des MAPK Signalweges und somit des Meningeomwachstums erreicht werden.

Einen weiteren therapeutischen Ansatz stellt die kombinierte Anwendung von monoklonalen Antikörpern dar. Dabei kommen etablierte Medikamente wie Cetuximab, ein monoklonaler Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, oder Imatinib als Inhibitor von PI3K/Akt in Frage. Es befinden sich jedoch weitere Substanzen in der Testphase, wie beispielsweise small molecule Tyrosinkinase-Inhibitoren oder Inhibitoren der Farnesyl-Transferase (Johnson und Toms 2005). Durch die simultane Blockade verschiedener, in der Meningeomgenese wichtiger Signalwege wird dabei wahrscheinlich der beste Effekt zu erzielen sein.

## 6.2 Diskussion der Methoden

### 6.2.1 Zellkultur

Eine endgültige Auswertung der Ergebnisse kann erst vorgenommen werden, nachdem mögliche methodische Fehlerquellen und andere Ungenauigkeiten näher beleuchtet wurden. Diese treten beispielsweise bereits bei der Kultivierung der Zellen auf, da Einfrieren, Auftauen, Teilen und Waschen zellulären Stress auslösen. Dieser wiederum führt zu einer unphysiologischen Genregulation, wodurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse herabgesetzt wird. Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontamination der Zellkulturen auszuschließen, wurden regelmäßig Kontrollen mittels Lichtmikroskop und PCR durchgeführt. Ebenfalls

problematisch ist die bei adhärent wachsenden Zellen auftretende Kontaktinhibition, welche in Kulturen mit einer Konfluenz von 100 Prozent wahrscheinlich wird. Um dies zu vermeiden, wurden die Versuche ausgewertet, bevor diese Schwelle erreicht wurde. Des Weiteren könnte es zu einer Gewöhnung der Zellen gegenüber dem PPAR $\gamma$ -Agonisten Rosiglitazon kommen, was durch eine mittlere Inkubationszeit von 48 h so gering wie möglich zu halten versucht wurde. Weiterhin wurde bei allen Zellversuchen eine Negativkontrolle und Ansätze mit verschiedenen Konzentrationen des Lösungsmittels Ethanol mitgeführt, um valide Vergleichsproben zu erhalten und die Fehler möglichst klein zu halten. Da in einigen Versuchen im Vergleich zur Negativkontrolle leichte zelltoxische Effekte durch die verwendeten Konzentrationen des Lösungsmittels zu verzeichnen waren, wurden die Versuchsergebnisse immer mit den entsprechenden Ethanolkontrollen verglichen, um den tatsächlichen Effekt der PPAR $\gamma$  Agonisten zu ermitteln.

#### 6.2.2 PCR

Bedingt durch die hohe Sensitivität der PCR wirken sich selbst geringe Schwankungen und variierende äußere Einflüsse sehr stark auf die jeweiligen Ergebnisse aus. Hierbei können kleinste Veränderungen das Ergebnis exponentiell verfälschen und zu falsch positiven Ergebnissen führen. Häufig sind Kontaminationen die Ursache für derartige falsch positive Ergebnisse. Speziell die Kontamination durch genomische DNA wurde hier jedoch bereits im Vorfeld durch DNase-Verdau weitestgehend ausgeschlossen. Weiterhin müssen unspezifische Primerbindungen als Fehlerquelle der PCR bedacht werden, welche anhand der Größe der entstandenen Produkte und der Anzahl der Banden aber gut überprüft werden konnten. Auch sollte berücksichtigt werden, dass schon kleinste Ungenauigkeiten beim Pipettieren (1  $\mu$ l cDNA und 24  $\mu$ l Mastermix pro Ansatz), die trotz größter Vorsicht nie gänzlich auszuschließen sind, in Veränderungen des Ergebnisses resultieren können.

### 6.2.3 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten immunologischen Nachweismethoden für Proteine beruhen auf unterschiedlichen Prinzipien. Mit der indirekten Immunfluoreszenz lassen sich Proteine in Zellen oder im Gewebe darstellen. Der Western Blot hingegen dient dem semiquantitativen Nachweis von Proteinen, wobei der Vergleich zwischen tatsächlicher Bandengröße und der zu erwartenden Größe des Proteins eine Aussage über die Spezifität der Bindung von Antikörper und Proteingemisch ermöglicht. Um unspezifische oder auch komplett fehlende Bindungen von Antikörpern und Proteingemischen auszuschließen oder spezifische Bindungen bestätigen zu können, sollten die Ergebnisse beider Methoden miteinander und mit denen der PCR verglichen werden. Die Betrachtung der Ergebnisse sollte nie isoliert, sondern nur im Gesamtzusammenhang mit den Ergebnissen der anderen Nachweismethoden erfolgen, um Fehler auszuschließen und eine kritische Bewertung zuzulassen.

Da PPAR $\gamma$  ein kernständiges Protein ist, wurde zur Herstellung der Lysate aus den Meningeomzelllinien, die anschließend im Western Blot aufgetragen werden sollten, ein Zellaufschluss mit Kernfraktionierung durchgeführt. Durch dieses Vorgehen wurde jedoch ein Großteil des im Zytoplasma vorkommenden Aktins aus den Proben entfernt. Dies bedingt die relativ schwachen Aktinbanden in den Blots der Zelllinien im Vergleich zu denen der Gewebeproben.

### 6.2.4 Proliferations- und MTT-Assay

Auch bei diesen Versuchen können Abweichungen der äußeren Bedingungen wie beispielsweise der Raumtemperatur oder Schwankungen beim Bestimmen der Zellzahl zur Verfälschung von Ergebnissen führen. Um diese Fehler möglichst gering zu halten, wurden die Versuche jeweils dreimal wiederholt und jeder Durchlauf mit drei parallelen Ansätzen pro Probe durchgeführt. Außerdem wurden bei allen Ansätzen eine Negativ- und zwei verschieden konzentrierte Ethanolkontrollen mitgeführt. Aus den neun Ergebnissen pro Probe wurde schließlich der Mittelwert errechnet und dieser mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt. Des Weiteren wurden die Platten immer vor dem Ausklopfen zentrifugiert, um einen



akzidentiellen Verlust von Zellen während dieses Vorgangs einzuschränken und so eine derart bedingte Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

## 7. Schlussfolgerung

Im Rahmen dieser Arbeit gelang erstmals der Nachweis, dass PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen unabhängig vom Malignitätsgrad exprimiert wird. Weiterhin konnte nach Stimulation von PPAR $\gamma$  mit Rosiglitazon eine signifikante Reduktion der Proliferation und Viabilität in humanen Meningeomzelllinien nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der Vulnerabilität gegenüber PPAR $\gamma$ -Agonisten zwischen der malignen und der benignen Zelllinie ließ sich dabei nicht feststellen. In wie weit die beobachteten Effekte PPAR $\gamma$ -vermittelt sind und welche anderen, PPAR $\gamma$ -unabhängigen Wirkungen der Glitazone dabei eine Rolle spielen, sollte Gegenstand weiterführender Forschung sein.

Das spezifische Vorkommen von PPAR $\gamma$  in humanen Meningeomen zusammen mit der nachgewiesenen Sensibilität von Meningeomzellen gegenüber Glitazonen lässt einen therapeutischen Einsatz dieser vielversprechend erscheinen. Speziell bei konventionell nicht oder schlecht therapierbaren Meningeomen wäre ein Einsatz von Glitazonen denkbar. Auf diese Weise könnten Komplikationen und Nebenwirkungen von Operation oder Radiatio vermieden werden. Die klinische Anwendung dieser Substanzklasse ist durch vielfältige bereits vorhandene Studien zur Verträglichkeit, Wirkung und Folgen im menschlichen Organismus deutlich erleichtert. Dennoch bedarf es noch umfassender *in vivo* Versuche, um therapeutischen Nutzen und Nebenwirkungen erfassen, analysieren und abwägen zu können.

Überlegenswert wäre auch der kombinierte Einsatz von Glitazonen mit anderen Substanzen, die beispielsweise in den MAP-Kinase- oder PI3K-Signalweg eingreifen. Auf diese Weise könnten additive bzw. synergistische antiproliferative Effekte genutzt und gleichzeitig durch Dosisreduktion der Einzelsubstanzen Nebenwirkungen vermindert werden.

## 8. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adams M, Reginato M, Shao D, Lazar M, Chatterjee V. 1997. Transcriptional activation by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  is inhibited by phosphorylation at a consensus mitogen-activated protein kinase site. *The Journal of Biological Chemistry*, 272 (8):5128-5132.
- Al-Mefti O, Kadri P, Pravdenkova S, Sawyer J, Stangeby D, Husain M. 2004. Malignant progression in meningioma: documentation of a series and analysis of cytogenetic findings. *J Neurosurg*, 101:210-218.
- Altiock S, Xu M, Spiegelman B. 1997. PPARgamma induces cell cycle withdrawal: inhibition of E2F/DP DNA-binding activity via down-regulation of PP2A. *Genes Dev*, 11 (15):1987-1998.
- Annegers J, Laws E, Kurland L. 1979. Head trauma and subsequent brain tumors. *Neurosurgery*, 4:203-206.
- Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. 2009. PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res*, 830501.
- Berg A, Combs T, Scherer P. 2002. ACRP30/adiponectin: an adipokine regulating glucose and lipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 13 (2):84-89.
- Boden G, Homko C, Mozzoli M, Showe L, Nichols C, Cheung P. 2005. Thiazolidinediones upregulate fatty acid uptake and oxidation in adipose tissue of diabetic patients. *Diabetes*, 54 (3):880-885.
- Bonofiglio D, Aquila S, Catalano S, Gabriele S, Belmonte M, Middea E, Qi H, Morelli C, Gentile M, Maggionlini M, Ando S. 2006. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-g Activates p53 Gene Promoter Binding to the Nuclear Factor-kB Sequence in Human MCF7 Breast Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*, 20 (12):3083-3092.
- Bouhlef M, Derudas B, Rigamonti E, Dièvert R, Brozek J, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Torpier G, Marx N, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. 2007 PPARgamma activation primes human monocytes into alternative M2 macrophages with anti-inflammatory properties. *Cell Metab*, 6 (2):137-143.
- Bruce W, Wolever T, Giacca A. 2000. Mechanisms linking diet and colorectal cancer: the possible role of insulin resistance. *Nutrition and Cancer*, 37 (1):19-26.

- Buccoliero A, Caldarella A, Taddei A, Di Lorenzo N, Gallina P, Mennonna P, Ammannati F, Taddei G. 2003. Atypical, aplastic, and unusual meningiomas. Morphology and incidence in 300 consecutive cases. *Pathologica*, 95 (2):83-88.
- Burstein H, Demetri G, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman B, Winer E. 2003. Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat*, 79 (3):391-397.
- Chao D, Korsmeyer S. 1998. BCL-2 FAMILY: Regulators of Cell Death. *Annu Rev Immunol*, 16:395-419.
- Condra K, Buatti J, Mendenhall W. 1997. Benign meningiomas: primary treatment selection affects survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 39:427-436.
- Coras R, Hölsken A, Seufert S. 2007. The Peroxisome Proliferator-Activated receptor-g agonist troglitazone inhibits transforming growth factor-b-mediated glioma cell migration and brain invasion *Molecular Cancer Therapeutics*, 6 (6):1745-1754.
- Cuevas I, Slocum A, Jun P, Costello J, Bollen A, Riggins G, McDermott M, Lal A. 2005. Meningioma transcript profiles reveal deregulated Notch signaling pathway. *Cancer Research*, 65 (12):5070-5075.
- Cui Y, Miyoshi K, Claudio E, Siebenlist U, Gonzalez F, Flaws J, Wagner K, Hennighausen L. 2002 Loss of the peroxisome proliferation-activated receptor gamma (PPARgamma ) does not affect mammary development and propensity for tumor formation but leads to reduced fertility. *J Biol Chem*, 277 (20):17830-17835.
- Day C. 1999. Thiazolidinediones: a new class of antidiabetic drugs. *Diabet Med*, 16 (3):179-192.
- Debevec D, Christian M, Morganstein D, Seth A, Herzog B, Parker M, White R. 2007. Receptor interacting protein 140 regulates expression of uncoupling protein 1 in adipocytes through specific peroxisome proliferator activated receptor isoforms and estrogen-related receptor alpha. *Mol Endocrinol*, 21 (7):1581-1592.
- DeMonte F. 1995. Current Management of meningiomas. *Onkology*, 9:83-96.
- Dumanski J, Rouleau G, Nordeskjold M. 1990. Molecular genetic analysis of chromosome 22 in 81 cases of meningioma. *Cancer Research*, 50:5863-5867.

- Dutour A, Kumar U, Panetta R. 1998. Expression of somatostatin receptor subtypes in human brain tumors. *Int J Cancer*, 76:620-627.
- Emery M, Leontiou C, Bonner S, Merulli C, Nanzer A, Musat M, Galloway M, Powell M, Nikookam K, Korbonits M, Grossman A. 2006. PPAR-gamma expression in pituitary tumours and the functional activity of the glitazones: evidence that any anti-proliferative effect of the glitazones is independent of the PPAR-gamma receptor. *Clin Endocrinol*, 65 (3):389-395.
- Engelhard H. 2001. Progress in the diagnosis and treatment of patients with meningiomas. Part 1: Diagnostic imaging, preoperative embolization. *Surgical Neurology*, 55:89-101.
- Evans D, Huson S, Donnai D. 1992. A clinical study of type 2 neurofibromatosis. *Qu J Med*, 84:603-618.
- Forman B, Tontonoz P, Chen J, Brun R, Spiegelman B, Evans R. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell*, 83 (5):803-812.
- Friend K, Radinsky R, McCutcheon I. 1999. Growth hormone receptor expression and function in meningiomas: Effect of a specific receptor antagonist. *J Neurosurg*, 91:93-99.
- Fuentes S, Chinot O, Dufour H, Paz-Paredes A, Metellus P, Barrie-Attarian M, Grisoli F. 2004. Hydroxyurea treatment for unresectable meningioma. *Neurochirurgie*, 50 (4):461-467.
- Gehring S, Tapia-Pérez J, Kirches E, Firsching R, Keilhoff G, Schneider T, Mawrin C. 2011. Cytotoxic effects of statins and thiazolidinediones on meningioma cells *J Neurooncol*, 102 (3):383-393.
- Girnun G, Naseri E, Vafai S, Qu L, Szwaya J, Bronson R, Alberta J, Spiegelman B. 2007. Synergy between PPARgamma ligands and platinum-based drugs in cancer. *Cancer Cell*, 11 (5):395-406.
- Girnun G, Smith W, Drori S, Sarraf P, Mueller E, Eng C, Nambiar P, Rosenberg D, Bronson R, Edelmann W, Kucherlapati R, Gonzalez F, Spiegelman B. 2002. APC-dependent suppression of colon carcinogenesis by PPARgamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (21):13771-13776.
- Giulia C, Adriana L, Elisabetta P. 2008. Rosiglitazone inhibits adrenocortical cancer cell proliferation by interfering with the IGF-IR intracellular signaling. . *PPAR Research Article ID 904041*:11.

- Goldsmith B, Wara W, Wilson C. 1994. Postoperative irradiation for subtotally resected meningiomas. *Neurosurgery*, 80:195-201.
- Govindarajan R, Ratnasinghe L, Simmons D, Siegel E, Midathada M, Kim L, Kim P, Owens R, Lang N. 2007. Thiazolidinediones and the risk of lung, prostate, and colon cancer in patients with diabetes. *J Clin Oncol*, 25 (12):1476-1481.
- Grommes C, Landreth G, Sastre M, Beck M, Feinstein D, Jacobs A, Schlegel U, Heneka M. 2006. Inhibition of in Vivo Glioma Growth and Invasion by Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Agonist Treatment. *Molecular Pharmacology*, 70 (5):1524-1533.
- Grunberg S, Weiss M, Russell C, Spitz I, Ahmadi J, Sadun A, Sitruk-Ware R. 2006. Long-term administration of mifepristone (RU486): clinical tolerance during extended treatment of meningioma. *Cancer Invest*, 24 (8):727-733.
- Gutmann C, Donahoe J, Perry A. 2000. Loss of DAL-1, a second protein 4.1 tumor suppressor, is an important early event in the pathogenesis of meningioma. *Human Molecular Genetics*, 9:1495-1500.
- Haase D, Schmidl S, Ewald C, Kalff R, Huebner C, Firsching R, Keilhoff G, Evert M, Paulus W, Gutmann D, Lal A, Mawrin C. 2010. Fatty acid synthase as a novel target for meningioma therapy. *Neuro Oncol*, 12 (8):844-854.
- Haffner S, Greenberg A, Weston W, Chen H, Williams K, Freed M. 2002. Effect of rosiglitazone treatment on nontraditional markers of cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*, 106 (6):679-684.
- Han S, Roman J. 2006. Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPAR $\gamma$ -dependent and PPAR $\gamma$ -independent signal pathways. *Mol Cancer Ther*, 5 (2):430-437.
- Han S RJ. 2007. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ : a novel target for cancer therapeutics? *Anticancer Drugs*, 18 (3):237-244.
- Hashimoto K, Farrow B, Evers B. 2004. Activation and role of MAP kinases in 15d-PGJ2-induced apoptosis in the human pancreatic cancer cell line MIA PaCa-2. *Pancreas*, 28 (2):153-159.
- He G, Sung Y, DiGiovanni J, Fischer S. 2006. Thiazolidinediones inhibit insulin-like growth factor-I-induced activation of p70S6 kinase and suppress insulin-like growth factor-I tumor-promoting activity. *Cancer Research*, 66 (3):1873-1879.

- Henze M, Schuhmacher J, Hipp P. 2001. PET imaging of somatostatin receptors using [<sup>68</sup>Ga]DOTA-D-Phe-Tyr-Octreotide: First results in patients with meningiomas. *Journal of Nuclear Medicine*, 42:1053-1056.
- Ho D-T, Hsu C-Y, Ting L-T, Chiang H. 2002. Histopathology and MIB-1 labeling index predicted recurrence of meningiomas. A proposal of diagnostic criteria for patients with atypical meningioma. *Cancer Research*, (94):1538-1547.
- Home P, Pocock S, Beck-Nielsen H, Gomis R, Hanefeld M, Jones N, Komajda M, McMurray J, RECORD SG. 2007. Rosiglitazone evaluated for cardiovascular outcomes--an interim analysis. *N Engl J Med*, 357 (1):28-38.
- Hu E, Kim J, Sarraf P, Spiegelman B. 1996. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, 274:2100-2103.
- Inskip P, Mellekjaer L, Gridley G, Olsen J. 1998. Incidence of intracranial tumors following hospitalization for head injuries (Denmark). *Cancer Causes Control*, 9:109-116.
- Inzucchi S, Maggs D, Spollett G, Page S, Rife F, Walton V, Shulman G. 1998. Efficacy and metabolic effects of metformin and troglitazone in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 338 (13):867-872.
- Issemann I, Green S. 1990. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*, 347:645-650.
- Jaaskelainen J. 1986. Seemingly complete removal of histologically benign intracranial meningioma: late recurrence rate and factors predicting recurrence in 657 patients. A multivariate analysis. *Surg Neurol*, 26 (5):461-469.
- Jaaskelainen J, Haltia M, Servo A. 1986. Atypical and anaplastic meningiomas: radiology, surgery, radiotherapy, and outcome. *Surg Neurol*, 25 (3):233-242.
- Jaaskelainen J, Haltia M, Laasonen E, Wahlstrom T, Valtonen S. 1985. The growth rate of intracranial meningiomas and its relation to histology. An analysis of 43 patients. *Surg Neurol*, 24 (2):165-172.
- Johnson M, Toms S. 2005. Mitogenic signal transduction pathways in meningiomas: novel targets for meningioma chemotherapy? *J Neuropathol Exp Neurol*, 64 (12):1029-1036.
- Johnson M, Okedli E, Woodard A, Toms S, Allen G. 2002. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase-Akt-p7S6K pathway activation and transduction

- of mitogenic signals by platelet-derived growth factor in meningioma cells. *J Neurosurg*, 97 (3):668-675.
- Johnson M, Sade B, Milano M, Lee J, Toms S. 2008. New prospects for management and treatment of inoperable and recurrent skull base meningiomas. *J Neurooncol*, 86 (1):109-122.
- Kalkanis S, Carroll R, Zhang J, Zamani A, Black P. 1996. Correlation of vascular endothelial growth factor messenger RNA expression with peritumoral vasogenic cerebral edema in meningioma. *Neurosurgery*, 85 (6):1095-1101.
- Kallio M, Sankila R, Hakulinen T, Jaaskelainen J. 1992. Factors affecting operative and excess long-term mortality in 935 patients with intracranial meningioma. *Neurosurgery*, 31 (1):2-12.
- Kepes J. 1982. Meningiomas. New York: Masson.
- Kliwer S, Umesono K, Mangelsdorf D, Evans R. 1992. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature*, 355:446-449.
- Kliwer S, Sundseth S, Jones S, Brown P, Wisely G, Koble C, Devchand P, Wahli W, Willson T, Lenhard J, Lehmann J. 1997. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (9):4318-4323.
- Konstantinidou A, Korkolopoulou P, Mahera H. 2003. Hormone receptors in non-malignant meningiomas correlate with apoptosis, cell proliferation and recurrence-free survival. *Histopathology*, 43:280-290.
- Lee S, Pineau T, Drago J, Lee E, Owens J, Kroetz D, Fernandez-Salguero P, Westphal H, Gonzalez F. 1995. Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol*, 15 (6):3012-3022.
- Lehmann J, Moore L, Smith-Oliver T, Wilkison W, Willson T, Kliwer S. 1995. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem*, 270 (22):12953-12956.
- Li A, Binder C, Gutierrez A, Brown K, Plotkin C, Pattison J, Valledor A, Davis R, Willson T, Witztum J, Palinski W, Glass C. 2004. Differential inhibition of



- macrophage foam-cell formation and atherosclerosis in mice by PPARalpha, beta/delta, and gamma. *J Clin Invest*, 14 (11):1564-1576.
- Lichter T, Kurpakus M, Gurney M. 1991. Differential expression of insulin-like growth factor II in human meningiomas. *Neurosurgery*, 29 (3):405-410.
- Lichter T, Kurpakus M, Gurney M. 1993. Expression of insulin-like growth factors and their receptors in human meningiomas. *J Neurooncol*, 17 (3):183-190.
- Lichter T, Spagnolo A, Glick R, Feinstein D. 2008. PPARg Thiazolidinedione Agonists and Immunotherapy in the Treatment of Brain Tumors. Hindawi Publishing Corporation, PPAR Research, 2008.
- Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*, 114 (2):97-109.
- Lusis E, Watson M, Chicoine M, Lyman M, Roerig P, Reifenberger G, Gutmann D, Perry A. 2005. Integrative genomic analysis identifies NDRG2 as a candidate tumor suppressor gene frequently inactivated in clinically aggressive meningioma. *Cancer Research*, 65:7121-7126.
- Maier H, Ofner D, Hittmair A, Kitz K, Budka H. 1992. Classic, atypical, and anaplastic meningioma: three histopathological subtypes of clinical relevance. *Neurosurgery*, 77 (4):616-623.
- Mason W, Gentili F, Macdonald D. 2002. Stabilization of disease progression by hydroxyurea in patients with recurrent or unresectable meningioma. *Neurosurgery*, 97:341-346.
- Mawrin C, Perry A. 2010. Pathological classification and molecular genetics of meningiomas. *J Neurooncol*, 99 (3):379-391.
- Mawrin C, Sasse T, Kirches E, Kropf S, Schneider T, Grimm C, Pambor C, Vorwerk C, Firsching R, Lendeckel U, Dietzmann K. 2005. Different activation of mitogen-activated protein kinase and Akt signaling is associated with aggressive phenotype of human meningiomas. *Clin Cancer Res*, 11 (11):4074-4082.
- McLendon R, Rosenblum M, Bigner D, Hrsg. 2006. Russell and Rubinstein's Pathology of Tumors of the Nervous System 7Aufl.: Hodder Arnold.
- Modha A, Gutin P. 2005. Diagnosis and treatment of atypical and anaplastic meningiomas: a review. *Neurosurgery*, 57 (3):538-550.

- Moldes M, Zuo Y, Morrison R, Silva D, Park B, Liu J, Farmer S. 2003. Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J*, 376 (3):607-613.
- Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y. 2000. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  by troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27(Kip1) in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Research*, 60 (19):5558-5564.
- Natarajan S, Sekhar L, Schessel D, Morita A. 2007. Petroclival meningiomas: multimodality treatment and outcomes at long-term follow-up. *Neurosurgery*, 60 (6):965-979.
- Nelson P, Setton A, Choi I. 1994. Current status of interventional neuroradiology in the management of meningiomas. *Neurosurg Clin N Am*, 5:235-259.
- Newton H, Scott S, Volpi C. 2004. Hydroxyurea chemotherapy for meningiomas: enlarged cohort with extended follow-up. *Br J Neurosurg*, 18 (5):495-499.
- Nissen S, Wolski K. 2007. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med*, 356 (24):2457-2471.
- Nolan J, Ludvik B, Beerdson P, Joyce M, Olefsky J. 1994. Improvement in glucose tolerance and insulin resistance in obese subjects treated with troglitazone. *N Engl J Med*, 331 (18):1188-1193.
- Nordqvist A, Peyrard M, Pettersson H. 1997. A high ratio of insulin-like growth factor II/insulin-like growth factor binding protein 2 messenger RNA as a marker for anaplasia in meningiomas. *Cancer Research*, 57:2611-2614.
- O'Connor R, Fennelly C, Krause D. 2000. Regulation of survival signals from the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochemical Society Transactions*, 28 (2):47-51.
- Odegaard J, Ricardo-Gonzalez R, Goforth M, Morel C, Subramanian V. 2007. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. *Nature*, 447:1116-1120.
- Ogawa S, Lozach J, Benner C, Pascual G, Tangirala R, Westin S. 2005. Molecular determinants of crosstalk between nuclear receptors and toll-like receptors. *Cell*, 122 (5):707-721.

- Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, Umesono K. 1998. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*, 101 (6):1354-1361.
- Perry A, Stafford S, Scheithauer B. 1997. Meningioma grading: an analysis of histologic parameters. *Am J Surg Pathol*, 22:1482-1490.
- Perry A, Scheithauer B, Stafford S. 1999. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients. *Cancer Research*, (85):2046-2056.
- Perry A, Cai D, Scheithauer B, Swanson P, Lohse C, Newsham I, Weaver A, Gutmann D. 2000. Merlin, DAL-1, and progesterone receptor expression in clinicopathologic subsets of meningioma: a correlative immunohistochemical study of 175 cases. *J Neuropathol Exp Neurol*, 59 (10):872-879.
- Perry A, SBW, Stafford S.L. 1999. "Malignancy" in meningiomas: a clinicopathologic study of 116 patients. *Cancer Research*, 85:2046-2056.
- Pieper D, Al-Mefty O, Hanada Y, Buechner D. 1999. Hyperostosis associated with meningioma of the cranial base: Secondary changes or tumor invasion. *neurosurgery*, 44:742-747.
- Powell E, Kuhn P, Xu W. 2007. Nuclear Receptor Cofactors in PPARgamma-Mediated Adipogenesis and Adipocyte Energy Metabolism. *PPAR Res*, 2007 (53843).
- Pravdenkova S, Al-Mefty O, Sawyer J, Husain M. 2006. Progesterone and estrogen receptors: opposing prognostic indicators in meningiomas. *J Neurosurg*, 105 (2):163-173.
- Provias J, Claffey K, delAguila L. 1997. Meningiomas: role of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in angiogenesis and peritumoral edema. *Neurosurgery*, 40:1016-1026.
- Puttmann S, Senner V, Braune S, Hillmann B, Exeler R, Rickert C, Paulus W. 2005. Establishment of a benign meningioma cell line by hTERT-mediated immortalization. *Lab Invest*, 85 (9):1163-1171.
- Rosen E, Sarraf P, Troy A, Bradwin G, Moore K, Milstone D, Spiegelman B, Mortensen R. 1999. PPAR gamma is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol*, 4 (4):611-617.

- Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J. 2005. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Exp Med*, 201 (8):1205-1215.
- Roux P, Blenis J. 2004. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68 (2):320-344.
- Ruttledge M, Xie Y, Han F. 1994. Deletions on chromosom 22 in sporadic meningioma. *Genes Chromosomes Cancer*, 10:122-130.
- Sadetzki S, Flint-Richter P, Ben-Tal T. 2002. Radiation induced meningioma: a descriptive study of 253 cases. *J Neurosurg*, 97:1078-1082.
- Sanson M, Cornu P. 2000. Biology of meningiomas. *Acta Neurochir (Wien)*, 142 (5):493-505.
- Sarbassov D, Ali S, Sabatini D. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. *Current Opinion in Cell Biology*, 17 (6):596-603.
- Sarraf P, Mueller E, Smith W, Wright H, Kum J, Aaltonen L, de la Chapelle A, Spiegelman B, Eng C. 1999. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer *Mol Cell Biol*, 3 (6):799-804.
- Schopfer F, Lin Y, Baker P, Cui T, Garcia-Barrio M, Zhang J, Chen K, Chen Y, Freeman B. 2005. Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102 (7):2340-2345.
- Schrell U, Fahlbusch R. 1991. Hormonal manipulation of cerebral meningiomas. In: Al-Mefti, Hrsg. *Meningiomas*. New York: Raven Press, 273-280.
- Sears I, MacGinnitie M, Kovacs L, Graves R. 1996. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol*, 16 (7):3410-3419.
- Sebolt-Leopold J, Herrera R. 2004. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nature Reviews Cancer* 4, 10.1038 (1503):937-947.
- Shintani T, Hayakawa N, Hoshi M. 1999. High incidence of meningioma among Hiroshima atomic bomb survivors. *J Radiat Res*, 40:49-57.

- Simon M, von Deimling A, Larson J, Wellenreuther R, Daskel P. 1995. Allelic losses on chromosomes 14, 10 and 1 in atypical and malignant meningiomas: a genetic model of meningioma progression. *Cancer Research*, 55:4696-4701.
- Simpson D. 1957. The recurrence of intracranial meningiomas after surgical treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 20 (1):22-39.
- Sinha R, Dufour S, Petersen K, LeBon V, Enoksson S, Ma Y. 2002. Assessment of skeletal muscle triglyceride content by (1)H nuclear magnetic resonance spectroscopy in lean and obese adolescents: relationships to insulin sensitivity, total body fat, and central adiposity. *Diabetes*, 51 (4):1022-1027.
- Smith M, Manola J, Kaufman D, George D, Oh W. 2004. Rosiglitazone versus placebo for men with prostate carcinoma and a rising serum prostate-specific antigen level after radical prostatectomy and/or radiation therapy. *Cancer Causes Control*, 101 (7):1569-1574.
- Spagnolo A, Grant E, Glick R, Lichter T, Feinstein D. 2007. Differential effects of PPAR $\gamma$  agonists on the metabolic properties of gliomas and astrocytes. *Neuroscience Letters*, 417 (1):72-77.
- Steppan C, Bailey S, Bhat S, Brown E. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409:307-312.
- Strickler H, Wylie-Rosett J, Rohan T. 2001. The relation of type 2 diabetes and cancer. *Diabetes Technology and Therapeutics*, 3 (2):263-274.
- Stylianopoulou F, Herbert J, Soares M, Efstratiadis A. 1988. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 (1):141-145.
- Surace E, Lusi E, Haipke C, Gutmann D. 2004. Functional significance of S6K overexpression in meningioma progression. *Ann Neurol*, 56 (2):295-298.
- Sutherland G, Florell R, Louw D, Choi N, Sima A. 1987. Epidemiology of primary intracranial neoplasms in Manitoba, Canada. *Can J Neurol Sci*, 14 (4):586-592.
- Tanaka K, Sato C, Maeda Y, Koike M, Matsutani M, Yamada K, Miyaki M. 1989. Establishment of a human malignant meningioma cell line with amplified *cmyc* oncogene. *Cancer Causes Control*, 64 (11):2243-2249.

- Todo T, Fahlbusch R. 1994. Accumulation of inositol phosphates in low-passage human meningioma cells following treatment with epidermal growth factor. *J Neurosurg*, 80 (5):890-896.
- Todo T, Adams E, Fahlbusch R, Dingermann T, Werner H. 1996. Autocrine growth stimulation of human meningioma cells by platelet-derived growth factor. *J Neurosurgery*, 84 (5):852-858.
- Tontonoz P, Hu E, Spiegelman B. 1994. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79 (7):1147-1156.
- Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale E, Spiegelman B. 1995. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol*, 15 (1):351-357.
- Tontonoz P, Singer S, Forman B, Sarraf P, Fletcher J. 1997. Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (1):237-241.
- Trujillo M, Scherer P. 2006. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev*, 27 (7):762-778.
- Vazquez F, Ramaswamy S, Nakamura N, Sellers W. 2000. Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function. *Molecular and Cellular Biology*, 20 (14):5010-5018.
- Vigneri P, Frasca F, Sciacca L, Frittitta L, Vigneri R. 2006. Obesity and cancer. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16 (1):1-7.
- von Deimling A, Kraus J, Stangl A. 1995. Evidence for subarachnoid spread in the development of multiple Meningeomas. *Brain Pathology*, 5:11-14.
- Waite K, Eng C. 2003. BMP2 exposure results in decreased PTEN protein degradation and increased PTEN levels. *Human Molecular Genetics*, 12 (6):679-684.
- Weber R, Bostrom J, Wolter M. 1997. Analysis of genomic alterations in benign, atypical and anaplastic meningiomas: towards a genetic model of meningioma progression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:14719-14724.
- Wei S, Yang J, Lee S, Kulp S, Chen C. 2009. PPARgamma-independent antitumor effects of thiazolidinediones. *Cancer Lett*, 276 (2):119-124.

- Wellen K, Hotamisligil G. 2005. Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest*, 115 (5):1111-1119.
- Weng J, Chen C, Pinzone J, Ringel M, Chen C. 2006. Beyond peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones. *Endocrine-Related Cancer*, 13:401-413.
- Willis J, Smith C, Ironside J, Erridge S, Whittle I, Everington D. 2005. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. *Appl Neurobiol*, 31 (2):141-149.
- Wu Z, Bucher N, Farmer S. 1996. Induction of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  during the conversion of 3T3 fibroblasts into adipocytes is mediated by C/EBP $\beta$ , C/EBP $\delta$ , and glucocorticoids. *Mol Cell Biol*, 16 (8):4128-4136.
- Yang S, Park C, Park S, Kim D, Chung Y, Jung H. 2008. Atypical and anaplastic meningiomas: prognostic implications of clinicopathological features. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 79 (5):574-580.
- Yu J, Javorschi S, Hevener A, Kruszynska Y, Norman R, Sinha M, Olefsky J. 2002. The effect of thiazolidinediones on plasma adiponectin levels in normal, obese, and type 2 diabetic subjects. *Diabetes*, 51 (10):2968-2974.
- Zander T, Kraus J, Grommes C, Schlegel U, Feinstein D. 2002. Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor PPAR $\gamma$ . *J Neurochem*, 81:1052-1060.

## **Danksagung**

Ich möchte mich hiermit bei all jenen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Promotion beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. habil. Christian Mawrin für die Vergabe der Doktorarbeit ebenso wie Anregungen und Diskussionen.

Herzlich bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Frau Dr. Daniela Haase, die mich mit ihrem Fachwissen und vielfältigen Anleitungen unterstützte und für die Planung von Versuchen sowie die kritische Auseinandersetzung mit Ergebnissen immer ein offenes Ohr hatte. Auch den weiteren Mitgliedern der Abteilung für Neuropathologie des Universitätsklinikums Jena gilt mein Dank, besonders Claudia Ranke und Claudia Döring für methodische Unterstützung, PD Dr. Bernd Romeike für konstruktive Anregungen und Britta Landfried für geduldige Erklärungen, Anleitungen und Diskussionen.

Des Weiteren möchte ich mich bei Sebastian Haumann, Sophia Partzsch und Lydia Wagner für ihre ausdauernde Unterstützung, Anregungen und Ideen beim Schreiben sowie beim Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Ein besonders lieber Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Familie, die mir jederzeit unterstützend zur Seite standen und nicht nur im Rahmen dieser Arbeit immer Rückhalt gaben und geben.



## **Ehrenwörtliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Mawrin und Dr. Haase

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 29.08.2011